

UNIVERSIDADE DO VALE DO TAQUARI - UNIVATES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU*
MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA

**IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA β -GALACTOSIDASE DE ORIGEM
MICROBIANA EM DIFERENTES SUPORTES**

Adriano Gennari

Lajeado, fevereiro de 2018

Adriano Gennari

IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA β -GALACTOSIDASE DE ORIGEM MICROBIANA EM DIFERENTES SUPORTES

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, da Universidade do Vale do Taquari - Univates, como parte da exigência para a obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia, na área de concentração de Biotecnologia Agroalimentar.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Claucia Fernanda Volken de Souza

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Giandra Volpato

Lajeado, fevereiro de 2018

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora, professora Cláucia, pelas orientações e conversas fundamentais para a condução experimental e análises dos resultados.

A professora Giandra, pela coorientação e disposição para discussões e definições acerca dos resultados.

Aos professores André, Edilson, Rafael e Raul, pelas contribuições nas diversas etapas deste trabalho.

A Francielle, meu braço direito, pelo comprometimento e ajuda com cada etapa desenvolvida na dissertação.

Sou profundamente grato a minha família, por todo apoio e suporte nestes dois anos.

Aos amigos de laboratório, que tornaram os árduos dias de laboratório em momentos alegres e descontraídos.

A CAPES, pela bolsa de mestrado.

RESUMO

A β -galactosidase é empregada pelas indústrias de laticínios no desenvolvimento de produtos lácteos com baixos teores de lactose. Entretanto, estes biocatalisadores possuem algumas limitações que dificultam sua aplicação industrial. Estas podem ser superadas através da imobilização enzimática, pois permite a reutilização da enzima e um maior controle reacional. O Immobead 150 é um suporte comercial formado de polímeros de metacrilato que contém grupamentos epóxi na sua superfície permitindo a ligação com grupos funcionais. Entre os suportes de baixo custo que podem ser utilizados na imobilização enzimática está o colágeno, uma proteína pouco solúvel na sua forma natural, organizada em fibras resistentes. A celulose microcristalina é outro material promissor para este processo, pois além de ser abundante e barata, possui excelentes propriedades físicas. O objetivo geral desse trabalho foi estudar o processo de imobilização das β -galactosidases de *Aspergillus oryzae* e *Kluyveromyces lactis* utilizando diferentes suportes. As matrizes utilizadas no processo foram o colágeno em pó, a celulose microcristalina e o Immobead. Estudos de cargas foram realizados a fim de determinar a melhor proporção enzima-suporte, além de diferentes tratamentos para funcionalizar essas matrizes. Os derivados obtidos que apresentaram melhores rendimentos e eficiências foram avaliados quanto a sua estabilidade térmica e ao armazenamento, condições operacionais de pH e temperatura e ciclos de reuso. Além disso, seus parâmetros cinéticos foram comparados com os da enzima livre. As cargas da enzima de *A. oryzae* na imobilização em Immobead, colágeno e celulose foram de 100, 1000 e 100 mg de proteína/g de suporte, respectivamente. Já para a β -galactosidase de *K. lactis* a carga de 100 foi a melhor nos três suportes. Em relação aos parâmetros cinéticos e as condições ótimas de catálise, diferentes comportamentos foram observados entre as diferentes enzimas e suportes. A aplicação em batelada da enzima imobilizada de *A. oryzae* nas soluções de substrato com pHs ácidos (solução de lactose e permeado) pode ser realizada por aproximadamente 35, 60 e 30 vezes quando imobilizada em Immobead, colágeno e celulose, respectivamente. A β -galactosidase de *K. lactis* por sua vez, resistiu por 35 ciclos de reuso, em soro de queijo e/ou leite, quando imobilizada em Immobead e 30 em colágeno e celulose. Com base nos resultados obtidos nesse trabalho, verificou-se que o suporte comercial Immobead, e outros dois materiais, colágeno e celulose, demonstram potencial como materiais para imobilização de β -galactosidases microbianas.

Palavras-chave: imobilização, β -galactosidase, colágeno, celulose, immobead.

ABSTRACT

*β -galactosidase is used by the dairy industries in the development of dairy products with low lactose content. However, these biocatalysts have some limitations that hinder their industrial application. These can be overcome through enzymatic immobilization, as it allows the reuse of the enzyme and a greater reaction control. Immobead 150 is a commercial support formed of methacrylate polymers containing epoxy groups on its surface allowing attachment to functional groups. Among the low-cost supports that can be used in enzymatic immobilization is collagen, a poorly soluble protein in its natural form, organized into resistant fibers. Microcrystalline cellulose is another promising material for this process, as it is abundant and inexpensive and has excellent physical properties. The general objective of this project was to study the immobilization process of the β -galactosidases of *Aspergillus oryzae* and *Kluyveromyces lactis* using different supports. The matrices used in the process were collagen powder, microcrystalline cellulose and Immobead. Load studies were performed in order to determine the best enzyme-support ratio, as well as different treatments to functionalize these matrices. The obtained derivatives that presented better yields and efficiencies were evaluated for their thermal and storage stability, pH and temperature operating conditions and reuse cycles. In addition, their kinetic parameters were compared with those of the free enzyme. The protein loads of the immobilization of *A. oryzae* on Immobead, collagen and cellulose were 100, 1000 and 100 mg protein/g support, respectively. For *K. lactis* β -galactosidase, the loading of 100 was the best in all three supports. Regarding the kinetic parameters and the optimal conditions of catalysis, different behaviors were observed between the different enzymes and supports. Batch application of the *A. oryzae* immobilized enzyme in substrate solutions with acid pHs (lactose solution and permeate) could be carried out for approximately 35, 60 and 30 times when immobilized on Immobead, collagen and cellulose, respectively. The β -galactosidase of *K. lactis*, in turn, resisted for 35 cycles of reuse in cheese and/or milk, when immobilized on Immobead and 30 on collagen and cellulose. Based on the results obtained in this work, the commercial support Immobead, and other two materials, collagen and cellulose, have shown potential as materials for the immobilization of microbial β -galactosidases.*

Keywords: immobilization, β -galactosidase, collagen, cellulose, immobead.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Hidrólise enzimática da lactose pela enzima β -galactosidase.....	19
Figura 2 - Métodos básicos para imobilização.....	20
Figura 3 - Classificação de suportes de acordo com sua composição.....	23
Figura 4 - Polímeros de metacrilato e grupamentos do Immobead 150.....	24
Figura 5 - Representação da estrutura do colágeno.....	24
Figura 6 - Estrutura polimérica da celulose microcristalina.....	26
Figura 7 - Representação esquemática dos principais tipos de reatores.....	27

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC	Acetato de celulose
Ac	<i>Acid Mixture/</i> Mistura ácida
Al	<i>Aluminum/</i> Alumínio
ANOVA	<i>Analysis Of Variance</i>
Ao	<i>Aspergillus oryzae</i>
BET	Brunauer, Emmett and Teller
BJH	Barret-Joyner-Halenda
CM	Celulose Microcristalina
CMC	Carboximetilcelulose
CN	Celulose Nanocristalina
Col	<i>Collagen</i>
DFT	<i>Density Functional Theory</i>
DSC	<i>Differential Scanning Calorimetry</i>
Epx	<i>Epoxi</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FTIR	<i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i>
Gal	β -galactosidase
Glu	<i>Glutaraldehyde/</i> Glutaraldeído
GOS	Galacto-oligossacarídeos
GRAS	<i>Generally Recognized As Safe</i>

H	Reação ácida
HAc	<i>Acetic Acid</i> / Ácido Acético
Ibead	Immobead
INPI	Instituto Nacional da Propriedade Industrial
Kl	<i>Kluyveromyces lactis</i>
OH	Reação alcalina
ONP	<i>ortho-nitrophenol</i>
ONPG	<i>ortho-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside</i>
PM	Partículas Magnéticas
SF	<i>Stabilization Factor</i>
TGA	<i>Thermogravimetric Analysis</i>
TPP	Tripolifosfato

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 OBJETIVOS	14
2.1 Objetivo Geral	14
2.2 Objetivos Específicos	14
3 REFERENCIAL TEÓRICO	16
3.1 Enzimas	16
3.2 β -Galactosidase.....	17
3.2.1 Hidrólise enzimática da lactose	18
3.3 Imobilização Enzimática	19
3.3.1 Métodos de Imobilização	19
3.3.2 Suportes para imobilização.....	22
3.3.2.1 Immobead	23
3.3.2.2 Colágeno.....	24
3.3.2.3 Celulose microcristalina	25
3.4 Reatores enzimáticos	27
3.4.1 Reator enzimático descontínuo ou em batelada	28
3.4.2 Reator enzimático contínuo	28
4 RESULTADOS	30
4.1 Modification of Immobead 150 support for protein immobilization: effects on the properties of immobilized <i>Aspergillus oryzae</i> β -galactosidase.	31
4.2 Chelation by collagen in the immobilization of <i>Aspergillus oryzae</i> β -galactosidase: a potential biocatalyst to hydrolyze lactose by batch processes.....	55
4.3 Hydrolysis of lactose by <i>Kluyveromyces lactis</i> β -galactosidase immobilized on Immobead: catalytic and operational characterization	64

4.4 Efeito da modificação química do colágeno nas propriedades estruturais e nas características catalíticas da enzima β -galactosidase de <i>Kluyveromyces lactis</i> immobilizada.	88
4.5 Nanocelulose ligada a nanopartículas magnéticas: suporte promissor para a imobilização de β -galactosidasas	104
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	120
5.1 Imobilização em Immobead	121
5.2 Imobilização em colágeno	122
5.3 Imobilização em celulose	123
5.4 Imobilização da β -galactosidase de <i>Aspergillus oryzae</i>	124
5.5 Imobilização da β -galactosidase de <i>Kluyveromyces lactis</i>	124
6 PERSPECTIVAS FUTURAS.....	126
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	127
ANEXOS	141
Anexo 1. Patente depositada no Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI) do processo de modificação do colágeno e imobilização da β -galactosidase.	141

1 INTRODUÇÃO

As enzimas são biocatalisadores de elevada seletividade e especificidade que realizam uma variedade de processos químicos sob diversas condições reacionais (ZANIN et al., 2004). Entre as principais vantagens da utilização de enzimas nas indústrias de alimentos destacam-se a rapidez de ação, a inexistência de toxidez e a possibilidade de utilização de pequenas concentrações devido a sua grande eficiência em condições suaves (AIRES-BARROS, 2002). A enzima β -galactosidase é cada vez mais empregada em aplicações industriais na indústria de laticínios. Essa enzima permite o desenvolvimento de produtos lácteos com baixos teores de lactose, além de contribuir para com as características sensoriais (LADERO et al., 2003). Entre as diferentes fontes desta enzima, estão as obtidas a partir do fungo filamentosso *Aspergillus oryzae* e a partir da levedura *Kluyveromyces lactis*. Estas enzimas, além de serem seguras para aplicação em alimentos (*Generally Recognized As Safe* - GRAS), possuem diferentes características às suas condições de hidrólise. A β -galactosidase de *A. oryzae*, por possuir pH ótimo ácido, é empregada na hidrólise da lactose de produtos lácteos fermentados e do soro ácido (HATZINILOLAOU et al., 2005). Já a lactase de *K. lactis* possui pH ótimo na faixa neutra (~7), o que direciona sua aplicação na hidrólise utilizando leite ou o soro doce (TELLO-SOLÍS et al., 2005).

Apesar de apresentarem excelentes perspectivas na catálise de reações, estes biocatalisadores geralmente possuem custo elevado e sua recuperação após a aplicação não é economicamente viável, pois se apresentam solúveis e estão em baixas concentrações (LÓPEZ-GALLEGO et al., 2005). A imobilização de enzimas vem sendo o método de maior sucesso proposto para superar essas limitações, uma vez que pode estabilizar a estrutura da enzima e, conseqüentemente, sua atividade (GROSOVÁ et al., 2008; REJIKUMAR e SUREKHA, 2001).

Esta técnica viabiliza a utilização das enzimas, pois permite a recuperação da mesma, reutilização do suporte, redução de custos com o processo contínuo e facilidade na interrupção das reações enzimáticas. Em alguns casos, pode também melhorar o desempenho do biocatalisador e reduzir significativamente a inativação da enzima por influência da temperatura e solventes orgânicos (JOCHEMS et al., 2011; KRAJEWSKA, 2004).

O suporte a ser utilizado para imobilização deve possuir grupos químicos que possam ser ativados ou modificados permitindo a ligação da enzima sem desnaturá-la. Além disso, precisam ser quimicamente resistentes durante o processo de imobilização e às condições em que se realiza a reação (MENDES et al., 2011). Para a imobilização dos biocatalisadores, a concentração dos grupamentos ativos na superfície do suporte deve ser adequada para interagir com os grupos reativos da enzima, sem prejudicar sua estrutura multimérica (BOLIVAR et al., 2009). Os suportes comerciais tais como os epóxis (Eupergit C[®], Sepabeads[®], e Immobead 150[®]), possuem excelentes características para a imobilização de enzimas, uma vez que combinam sua forma química com os grupos químicos presentes em sua superfície.

O Immobead 150 é um suporte formado por polímeros de metacrilato, e que contém grupamentos epóxi na sua superfície. Este suporte tem sido empregado na imobilização de enzimas através de ligação covalente multipontual por meio de seus grupos amino, fenólicos e tióis em pH alcalino, ou os seus grupos carboxílicos em pH moderadamente ácido (MATEO et al., 2007; TORRES-SALAS et al., 2011). Entretanto, o custo destes materiais sintéticos geralmente é elevado, o que dificulta sua aplicação em grande escala. Desta forma, há uma constante busca por materiais alternativos que possuam baixo custo, e que não prejudiquem a atividade catalítica de enzimas. Entre estes possíveis materiais, destacam-se o colágeno e a celulose.

O colágeno é uma proteína pouco solúvel na sua forma natural organizada em fibras resistentes. Pode ser encontrado na pele, tendões, ligamentos e ossos (NEKLYUDOV, 2003). Por conter abundantes grupos funcionais como, -OH, -COOH, -CONH₂ e -NH₂, a estrutura do colágeno pode ser modificada para ativar esses grupamentos, melhorando sua interação com outras proteínas. Além disso, o colágeno possui a capacidade de reagir com diversos íons metálicos, tais como Fe (III), Al (III) e Zr (IV). A celulose, por sua vez, é um polímero semicristalino com ligações glicosídicas β -1,4 entre unidades D-glicopirranose e com muitos grupos hidroxílicos e uma rede de ligações de hidrogênio que podem ser exploradas nos processos de imobilização (HUANG et al., 2011). A celulose é abundante e barata, com excelentes propriedades físicas para utilização em aplicações alimentares, farmacêuticas e

químicas (SHOSEYOV et al., 2006). Esse polissacarídeo pode ser obtido em diferentes formas estruturais; a celulose microcristalina é uma delas, podendo ser obtida por meio de hidrólises ácida ou alcalina e apresenta alta reatividade, renovabilidade e biodegradabilidade (REDDY e RHIM, 2014; SHANKAR e RHIM, 2016). Além disso, possui uma área superficial elevada, o que permite uma grande interação com outros compostos (KLEMM et al., 2011).

Embora alguns métodos básicos de imobilização tais como adsorção, encapsulamento e ligações iônicas e covalentes sejam seguidos, muitas combinações destas técnicas têm sido desenvolvidas (SIRISHA et al., 2016). Assim, estudos nessa área se fazem necessários, pois não existem métodos universais ou totalmente eficientes para imobilização enzimática, o que existe é uma gama de possibilidades, parâmetros e aplicações (KLEIN, 2010). Até a data de levantamento destes dados, não há na literatura estudos de imobilização que utilizem o colágeno em pó como suporte. Os relatos que se tem são voltados para as fibras do colágeno e, além disso, a enzima β -galactosidase ainda não foi estudada neste processo. Em relação à celulose microcristalina, alguns estudos já utilizam essa matriz, mas relatos em que as lactases fossem empregadas não foram encontrados. Tanto o colágeno em pó quanto a celulose microcristalina despertam interesse devido ao seu baixo custo, e dessa forma podem ser alternativas viáveis para a aplicação de enzimas imobilizadas nas indústrias. O Immobead, por sua vez, tem sua utilização mais explorada em processos de imobilização. Entretanto, relatos do seu emprego com a enzima β -galactosidase ainda não foram reportados.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o processo de imobilização das enzimas β -galactosidases comerciais de *Aspergillus oryzae* e *Kluyveromyces lactis* utilizando diferentes suportes.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o rendimento e a eficiência do processo de imobilização das β -galactosidases em Immobead com e sem modificação química, utilizando diferentes cargas de enzima;
- Desenvolver os processos de imobilização das β -galactosidases em colágeno, aplicando diferentes estratégias de tratamentos químicos do suporte e concentrações distintas de proteína;
- Estudar a obtenção de nanocelulose a partir dos processos de hidrólise ácida ou alcalina da celulose microcristalina, com posterior ligação à nanopartículas magnéticas, e sua potencial aplicação como suporte para imobilização das duas enzimas comerciais;
- Caracterizar as enzimas na forma livre e imobilizadas nos três diferentes suportes quanto as suas propriedades biocatalíticas de: condições operacionais ótimas (pH e temperatura); parâmetros cinéticos; estabilidades térmica e de armazenamento; e reusabilidade na hidrólise da lactose presente no leite, no soro de queijo, no permeado de soro e numa solução de lactose pura, em processos de batelada;
- Estudar estruturalmente os suportes modificados e os derivados produzidos por meio de: microscopia eletrônica de varredura, análises termogravimétricas, calorimetria exploratória diferencial e espectroscopia de infravermelho;

- Determinar o efeito da modificação química e dos processos de imobilização em Immobead, nas características de textura do suporte (área superficial, tamanho de poros e isothermas de adsorção e dessorção).

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Enzimas

Diversas metodologias foram desenvolvidas nas últimas décadas permitindo a produção de uma gama de novos produtos pelas indústrias alimentícias, têxteis, de papel, de fármacos, agrícola, entre outras. Entretanto, as técnicas alternativas utilizando enzimas tem sido objetivo de intensos estudos, uma vez que além de serem eficientes e seguras, apresentam menor impacto ambiental (KRAJEWSKA, 2004; HASAN et al., 2004; RESHMI et al., 2007). Enzimas são biocatalisadores que possuem propriedades adequadas para aplicação industrial, tais como elevadas seletividade e especificidade. Como a catálise geralmente pode ser realizada em condições amenas de pressão e temperatura, a utilização de enzimas em processos industriais vem crescendo cada vez mais, sendo consideradas como importante componente do desenvolvimento industrial sustentável (ZANIN et al., 2004).

Em função de sua alta especificidade, relacionada à sua complexa conformação tridimensional, a catálise enzimática não gera reações secundárias, resultando somente nos produtos específicos da catálise, e dessa forma, a catálise enzimática pode atingir rendimentos reacionais mais elevados. Além disso, as enzimas não apresentam problemas de descarte, pois sendo proteínas, podem ser facilmente inativadas e degradadas por microrganismos (OLIVEIRA, 2007). Estes biocatalisadores podem ser ativados ou inativados pelo calor. Dessa forma, a temperatura do processo pode ser a propriedade mais importante na aplicação dessas proteínas nas diferentes catálises reacionais (EMREGUL et al., 2006).

A investigação da aplicação de enzimas como catalisadores teve seu foco ampliado a partir da década de 60. Diversas enzimas, tais como amilases, lipases, proteases, lacases,

invertases e β -galactosidases são cada vez mais usadas como biocatalisadores nos processos industriais (CAO, 2005). Entre as principais vantagens da utilização destas proteínas na indústria de alimentos destacam-se a rapidez de ação, a inexistência de toxidez e a possibilidade de utilização de pequenas concentrações devido a sua alta eficiência em condições amenas (AIRES-BARROS, 2002).

As propriedades cinéticas das enzimas dependem da sua estrutura terciária e também quaternária. A inativação destas pode ser causada por diversos fatores, como pH, temperatura e solventes hidrofóbicos. Dessa forma, o armazenamento e o processamento representam fatores cruciais na manutenção dos biocatalisadores ativos, para que possam desempenhar sua atividade catalítica (ZANIN et al., 2004).

3.2 β -Galactosidase

As β -galactosidases, também conhecidas como lactases, são enzimas cada vez mais empregadas na indústria de laticínios, tendo como função hidrolisar a lactose do leite, e de subprodutos, como soro de queijo e permeado de soro. Tendo em vista que cerca de 70% da população mundial sofre com alterações nos níveis de síntese dessa enzima, o desenvolvimento de produtos lácteos com baixos teores de lactose vem sendo uma alternativa tecnológica para as indústrias (LADERO et al., 2003; PAULA e PEREIRA, 2014). A aplicação da β -galactosidase leva ainda à formação de açúcares mais solúveis e de maior digestibilidade, menos propícios à cristalização, além de enriquecer o produto hidrolisado com galacto-oligossacarídeos (GOS) (TANRISEVEN e DOGAN, 2002; MARQUEZ et al., 2003). A hidrólise enzimática da lactose, formando glicose e galactose, tem se mostrado um método promissor quando comparado a hidrólise ácida na produção de leite e derivados com concentrações reduzidas desse dissacarídeo (SANTIAGO et al., 2004).

Esta enzima pode ser obtida de diversas fontes como animais, fungos, bactérias e vegetais. Devido às suas origens distintas, estes biocatalisadores apresentam características físicas e químicas diferentes em relação às suas condições ótimas de atuação (GEKAS e LOPEZ-LEIVA, 1985). As β -galactosidases que são obtidas de fungos filamentosos normalmente possuem atividade ótima na faixa ácida de pH (3,0-6,0), enquanto o pH ótimo de atuação das enzimas provenientes de leveduras e bactérias situa-se numa região mais neutra (6,0-7,5) (FREITAS et al., 2011; PANESAR et al., 2010). Estas diferentes condições ótimas de pH e temperatura, permitem selecionar a fonte de β -galactosidase mais apropriada para uma aplicação específica. Desta forma, lactases provenientes de fungos filamentosos são mais

adequadas para hidrólise de soro ácido, enquanto que lactases de leveduras e bactérias tem melhor rendimento em hidrólise do soro doce e do leite (GEKAS e LÓPEZ-LEIVA, 1985).

De acordo com a Resolução RDC nº 205/2006, a enzima lactase utilizada pela indústria de alimentos deve ser de origem microbiana, proveniente dos seguintes microrganismos: *Aspergillus niger*, *A. oryzae*, *Candida pseudotropicalis*, *Kluyveromyces lactis*, *K. fragilis*, *K. marxianus*, *Saccharomyces sp.* (BRASIL, 2006). Estas espécies são classificadas como *Generally Recognized As Safe* (GRAS) pela *Food and Drug Administration* (FDA), sendo esse um importante critério para aplicações em alimentos.

A β -galactosidase de *A. oryzae* possui estrutura monomérica, e massa molecular de aproximadamente 90 kDa. Apresenta como inibidor competitivo a galactose, e não necessita de íons ativadores. Esta enzima é empregada na hidrólise da lactose de produtos lácteos fermentados e do soro ácido devido ao seu pH ótimo ácido e alta estabilidade térmica (HATZINILOLAOU et al., 2005; TELLO-SOLÍS et al., 2005).

A β -galactosidase de *K. lactis* apresenta-se como um dímero, composto de duas subunidades iguais, e possui uma massa molecular de 200 kDa. Possui como inibidores a galactose (competitivo) e a glicose (não competitivo) (USTOK et al., 2010). A atividade desta enzima é sensível a íons como zinco e cobre, em baixas concentrações, e cálcio em elevadas concentrações. Contudo, a β -galactosidase de *K. lactis* também possui íons ativadores, tais como magnésio, manganês e potássio, que podem aumentar sua atividade enzimática (DSM FOOD SPECIALITIES, 2009).

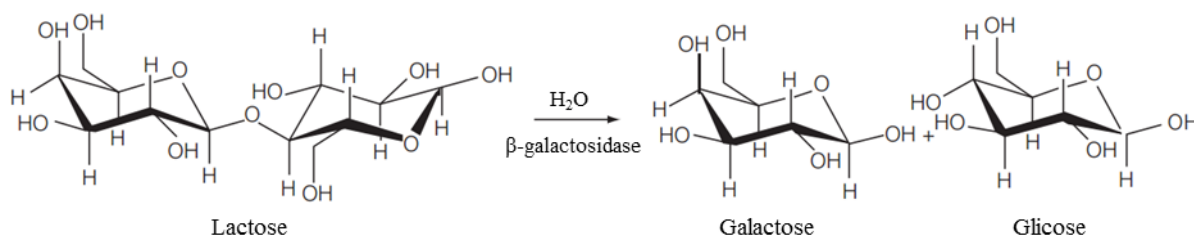
3.2.1 Hidrólise enzimática da lactose

A lactose é um carboidrato presente em leites, a única fonte natural significativa deste açúcar. Este dissacarídeo não pode ser absorvido prontamente pelo organismo humano e precisa ser hidrolisado em seus monossacarídeos correspondentes, glicose e galactose, pela ação da β -galactosidase presente no intestino delgado (WONG e HAERTEL, 2014).

Para os indivíduos com intolerância a lactose, o consumo de leite e produtos lácteos pode causar dor abdominal, diarreia, flatulência, entre outros sintomas desagradáveis. Este problema pode ser evitado se a lactose do leite e de produtos lácteos for previamente hidrolisada em seus açúcares prontamente digeríveis, para possibilitar assim, o consumo destes produtos nutricionalmente ricos por pessoas intolerantes ao dissacarídeo (PAULA e PEREIRA, 2014; MATTAR e MAZO, 2010; YANG et al., 2014).

A hidrólise enzimática da lactose apresentada na Figura 1 é um importante processo biotecnológico para a indústria alimentícia, devido ao seu efeito benéfico em alimentos que contêm lactose. A aplicação deste processo, além de permitir o consumo destes produtos por intolerantes à lactose, leva a uma melhoria das características tecnológicas e sensoriais dos produtos lácteos de forma a evitar a cristalização da lactose, e aumentar seu poder adoçante (JURADO et al., 2002). Esta tecnologia ainda permite a formação de GOS, que favorecem o crescimento bacteriano da microbiota intestinal (MANERA, 2006). Apesar de apresentarem excelentes perspectivas na catálise industrial, estes biocatalisadores normalmente possuem um custo elevado e geralmente sua recuperação após a aplicação não é economicamente viável, pois se apresentam solúveis e estão em baixas concentrações (LÓPEZ-GALLEG0 et al., 2005).

Figura 1 - Hidrólise enzimática da lactose pela enzima β -galactosidase.



Fonte: Adaptado de MARTINS e BURKERT (2009).

3.3 Imobilização Enzimática

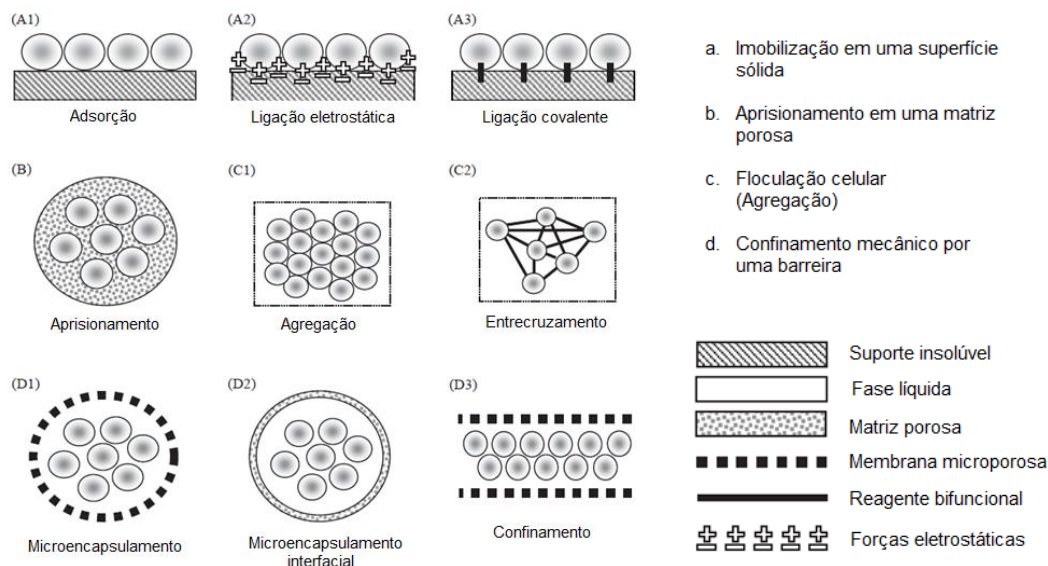
A imobilização enzimática vem sendo a alternativa de maior sucesso para superar as limitações do emprego da enzima livre nas catálises (GROSOVÁ et al., 2008). Esta técnica viabiliza ainda mais a utilização das enzimas, pois permite a reutilização deste biocatalisador e uma redução do volume de reação, pois a enzima imobilizada pode ser utilizada com uma alta concentração em um menor volume de reator. Também proporciona a interrupção das reações enzimáticas, evita a contaminação do produto com o catalisador e, em alguns casos, pode melhorar o desempenho do biocatalisador, reduzindo a inativação da enzima por influência da temperatura e de solventes orgânicos (JOCHEMS et al., 2011; KRAJEWSKA, 2004).

3.3.1 Métodos de Imobilização

Diferentes métodos têm sido empregados na imobilização de enzimas. Entre os métodos básicos de imobilização mais utilizados estão adsorção, ligação eletrostática, ligação covalente,

inclusão e entrecruzamento (SHELDON e VAN PELT, 2013). A Figura 2 apresenta os diferentes métodos de imobilização e os tipos de matrizes envolvidas em cada processo.

Figura 2 - Métodos básicos para imobilização.



Fonte: Adaptado de KOURKOUTAS et al., 2004

A imobilização por adsorção é a mais simples e baseada em interações físicas fracas, tais como forças de Van der Waals, ligações de hidrogênio e interação dipolo-dipolo, entre a enzima e o suporte. Esse processo consiste na exposição de uma solução enzimática com o suporte sob condições apropriadas. Fatores como pH e força iônica da solução, quantidade de enzima, tempo de contato e temperatura têm uma influência direta no resultado do processo. Além disso, é uma técnica de fácil preparação e possibilita o reuso do suporte (CABRAL, 2001; OSMAN et al., 2005). Dentre as vantagens do método de adsorção pode-se citar a simplicidade e a manutenção da conformação da enzima e do seu sítio ativo, pois não há formação de ligação química entre o suporte e a enzima. O método possui, por outro lado, a desvantagem de necessitar de um controle rigoroso das condições de processo durante a utilização da enzima imobilizada, para que as fracas interações entre a proteína e o adsorvente sejam mantidas (SHELDON e VAN PELT, 2013; SPAHN e MINTEER, 2008). Uma estratégia adotada para aumentar a estabilidade dessa interação é uma etapa adicional de entrecruzamento (GEKAS e LÓPEZ-LEIVA, 1985). No entanto, este método é limitado pela tendência de dessorção da enzima do suporte e pela sensibilidade às condições do ambiente, como temperatura e concentração de íons (GROSOVÁ et al., 2008).

O método de ligações eletrostáticas se baseia na formação de ligação iônica entre a enzima e o suporte. As trocas iônicas podem ocorrer juntamente com a imobilização por adsorção, e sua principal diferença é a intensidade da interação enzima-suporte, mais forte no caso da iônica (ALMEIDA et al., 2005). De acordo com Marquez (2007), esse método tem como vantagens a possibilidade de reutilização do suporte, baixo custo e simplicidade do método. Como desvantagem, há a possibilidade de desprendimento da enzima do suporte, quando houver variação no pH e na força iônica do meio. Os suportes utilizados podem ser tanto inorgânicos quanto orgânicos, sendo que as resinas de troca iônica se destacam nestas técnicas de imobilização (JURADO et al., 2004).

O método mais utilizado para imobilização de β -galactosidases é o de ligação covalente. Normalmente necessita de duas etapas, uma primeira para ativação do suporte, de forma a gerar um grupo eletrofílico que se liga ao grupo amino (nucleofílico) da enzima numa segunda etapa (GEKAS e LÓPEZ-LEIVA, 1985). A força das ligações formadas são superiores aos demais métodos, tornando essa uma de suas principais vantagens. Além disso, tem-se a disposição uma grande variedade de grupamentos químicos para ativação de suportes (FREITAS, 2007; GROSOVÁ et al., 2008). Como desvantagem dessa técnica, a forte ligação formada pode, em alguns casos, afetar o sítio ativo, levando a perda da atividade enzimática. Outro fator a ser considerado é a necessidade em se conhecer a estrutura da enzima, para que dessa forma, a mais adequada etapa de funcionalização/ativação possa ser estabelecida (FREITAS, 2007).

Nas técnicas de inclusão, como o encapsulamento, o aprisionamento e o confinamento, as enzimas são aprisionadas dentro da estrutura interna de alguns materiais na forma de géis, microcápsulas, fibras, filmes ou membranas. O encapsulamento é uma técnica similar a inclusão, e que protege a enzima do meio externo (LALONDE e MARGOLIN, 2002). Nestes processos geralmente uma solução contendo a enzima e o material polimérico é preparada, e então uma técnica de secagem ou polimerização é utilizada para se obter o material polimérico contendo a enzima (KLEIN, 2010). Uma desvantagem deste tipo de imobilização é a questão difusional durante os repetidos usos, mesmo que a matriz possua pequenos poros. Estes métodos são limitados para processos em que os substratos possuam baixo peso molecular, pois estes precisam atravessar a membrana para ter acesso à enzima (GROSOVÁ et al., 2008).

Na imobilização por entrecruzamento há interações intermoleculares entre as enzimas e o suporte, gerando ligações irreversíveis (OLIVEIRA, 2007). Nesta técnica de imobilização, as enzimas estão ligadas umas às outras e às proteínas inativas (gelatina, albumina), de forma a criar uma estrutura tridimensional complexa. O entrecruzamento é geralmente utilizado em

conjunto com outros métodos, podendo ser físicos ou químicos (adsorção ou ligação covalente, respectivamente) (GROSOVÁ et al., 2008). Como desvantagens do método estão a baixa retenção da atividade e a baixa estabilidade às condições mecânicas do processo de reuso, o qual dificulta sua aplicação industrial, além da baixa reprodutibilidade (SHELDON et al., 2007).

As técnicas de adsorção têm sido utilizadas para imobilização de diversas enzimas, tais como lipases (RUEDA et al., 2016; RAMOS et al., 2015), lacases (XU et al., 2014; PANG et al., 2016) e pectinases (RAJDEO et al., 2016; LIU et al., 2010). Métodos de troca iônica também vêm sendo estudados (WARD et al., 2015; ESLAMIPOUR e HEJAZI, 2015; WANG et al., 2015), sendo como principal foco a aplicação de membranas ou resinas de troca iônica como suporte para a imobilização. As técnicas de imobilização por ligação covalente (SYED et al., 2016; ALAGOZ et al., 2016; HASHEM et al., 2016; PATEL et al., 2016; KRZEK et al., 2016) e pelos métodos de aprisionamento (GARCIA et al., 2016; OZSEKER e AKKAYA, 2016; AMARA et al., 2016; LE et al., 2016; MORENO-CORTEZ et al., 2015) são as mais exploradas nos estudos recentes para as mais diversas enzimas.

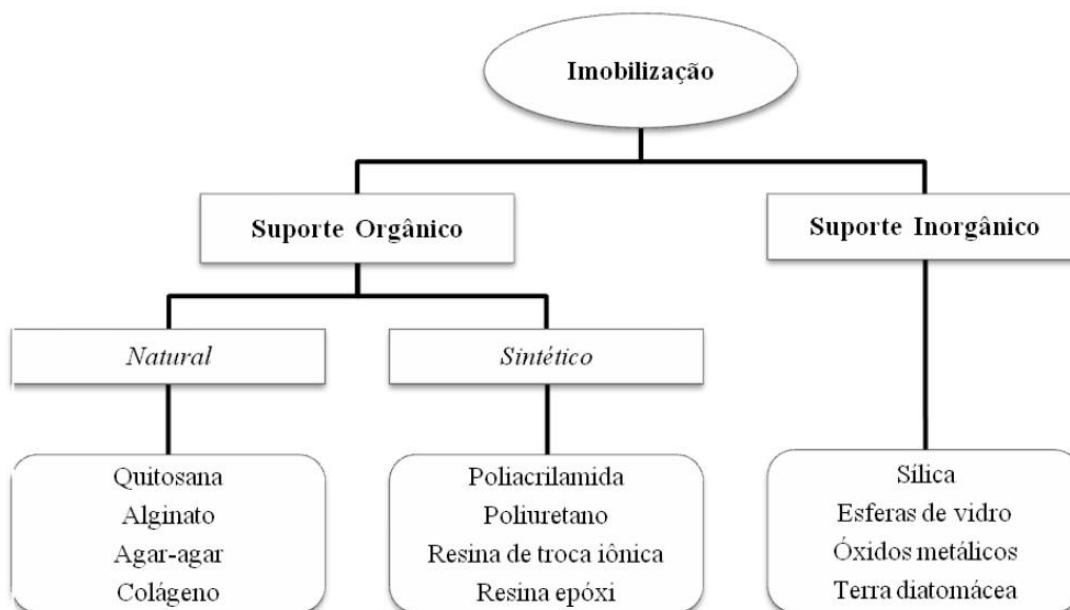
A enzima β -galactosidase também tem sido empregada na imobilização por diferentes metodologias, tais como adsorção (KLEIN et al., 2016; PRIETO et al., 2014), troca iônica (ALBUQUERQUE et al., 2016; GUIDINI et al., 2011), ligação covalente (WAHBA, 2016; CAREVIC et al., 2016) e encapsulamento (ZHANG et al., 2016; ESTEVINHO et al., 2015).

3.3.2 Suportes para imobilização

O suporte a ser utilizado para imobilização deve possuir grupos químicos que possam ser ativados ou modificados, permitindo a ligação da enzima sem desnaturá-la. Além disso, precisam ser quimicamente resistentes durante o processo de imobilização e às condições em que se realiza a reação (MENDES et al., 2011). Para a imobilização dos biocatalisadores, a concentração dos grupamentos ativos na superfície do suporte deve ser adequada para interagir com os grupos reativos da enzima, sem prejudicar sua estrutura multimérica (BOLIVAR et al., 2009).

A Figura 3 apresenta diversos suportes utilizados na imobilização de enzimas e sua respectiva classificação. Os materiais sintéticos podem formar um suporte ideal através da combinação de sua forma física e de sua estrutura química. Por outro lado, sua principal desvantagem é o custo elevado. Já os materiais naturais, além de geralmente serem de baixo custo, são biodegradáveis (MENDES et al., 2011).

Figura 3 - Classificação de suportes de acordo com sua composição.



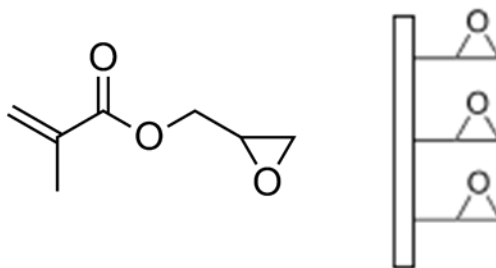
Fonte: Adaptado de JESIONOWSKI et al., 2014

Também tem sido demonstrado que a natureza do suporte, principalmente a morfologia interna e a hidrofobicidade da superfície, pode afetar as propriedades finais da enzima imobilizada, tais como a sua atividade, estabilidade, seletividade e especificidade (GARCIA-GALAN et al., 2014).

3.3.2.1 Immobead

Immobead 150 é um suporte comercial formado de polímeros de metacrilato (Figura 4), contendo grupamentos epóxi na sua superfície e com um tamanho médio de partícula de 0,15-0,30 mm (MATEO et al., 2007). Suportes que contenham grupos epóxi são caracterizados como tendo braços espaçadores curtos e sendo muito estáveis a pH neutro. Eles têm sido relatados na imobilização de enzimas através de ligação covalente multipontual por meio de seus grupos amino, fenólicos e tióis em pH alcalino, ou os seus grupos carboxílicos em pH moderadamente ácido (MATEO et al., 2007; TORRES-SALAS et al., 2011). A funcionalização do Immobead por meio de grupamentos aldeído é uma estratégia para melhorar a imobilização de enzimas, devido à ausência de impedimento estereoquímico para a reação química entre os grupos aldeído e os grupos amino na enzima (GUISAN, 1988).

Figura 4 - Polímeros de metacrilato e grupamentos do Immobead 150.

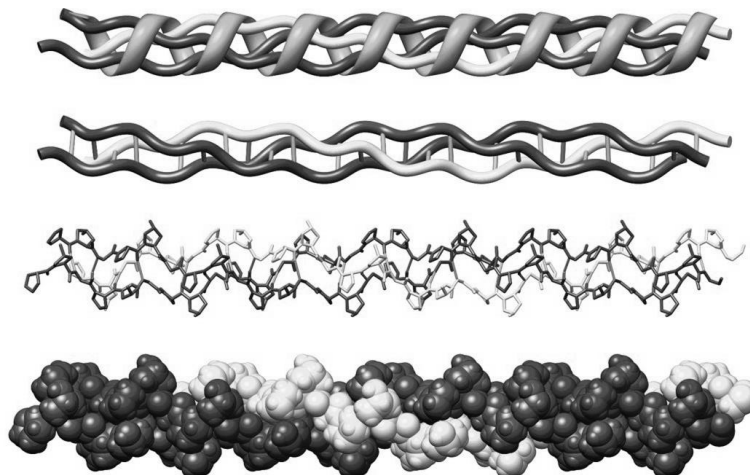


Poppe et al. (2013) imobilizaram duas lipases em suporte Immobead 150 funcionalizado com grupamentos aldeído. A eficiência de imobilização obtida foi superior a 96% para ambas as enzimas, demonstrando a possibilidade de aplicação dos derivados em síntese de biodiesel. Alagoz et al. (2016) também realizaram um tratamento no Immobead visando a inclusão de grupos aldeído na sua superfície, para posterior imobilização de formato desidrogenases. Os resultados encontrados mostraram uma maior atividade da enzima após o processo de imobilização. Além disso, o uso de Immobead modificado melhorou a estabilidade da enzima nos ensaios de temperatura e pH operacional.

3.3.2.2 Colágeno

O colágeno (Figura 5) é uma proteína pouco solúvel na sua forma natural, organizada em fibras resistentes, e encontrada na pele, tendões, ligamentos e ossos (NEKLYUDOV, 2003). Os principais estudos com este material são voltados para a melhoria de suas propriedades físico-químicas, mecânicas e de processamento (UTRAKI, 1990).

Figura 5 - Representação da estrutura do colágeno.



A extração do colágeno pode ser realizada de maneira que se obtenha a fibra, e seu subproduto, o pó, ambos em estado bruto e que apresentam a mesma composição (WOLF, 2007). As propriedades mecânicas singulares estão entre as principais características do colágeno, além do fato de ser quimicamente inerte e possuir uma composição diversificada de aminoácidos (NEKLYUDOV, 2003).

Há um aumento no interesse pelo processo de extração do colágeno e seus derivados, em razão da tendência de utilização dessa proteína para substituição de agentes sintéticos nos mais diversos processos industriais (KARIM e RAJEEV, 2008; GÓMEZ-GUILLÉN et al., 2011). A partir do colágeno bruto podem ser obtidos a fibra de colágeno, o colágeno em pó, o colágeno parcialmente hidrolisado (gelatina) e o colágeno hidrolisado. Para obtenção de um colágeno com qualidade, diversos processos de tratamento químico são necessários na extração desta proteína (GÓMEZ-GUILLÉN et al., 2011; SCHRIEBER e GAREIS, 2007). Os tratamentos químicos são realizados de diferentes formas, dependendo da origem do colágeno. Em geral, os tratamentos mais utilizados são com ácidos, álcalis e enzimas (GÓMEZ-GUILLÉN et al., 2011; PRESTES et al., 2013).

A fibra de colágeno é obtida a partir do colágeno bruto, e um processo de micronização é o que a diferencia do colágeno em pó. Para a produção da gelatina, o colágeno passa por um processo de hidrólise parcial, enquanto que o colágeno hidrolisado é obtido por hidrólise química e/ou enzimática, gerando um produto solúvel em água e sem capacidade de geleificação (DAMORADAN et al., 2010).

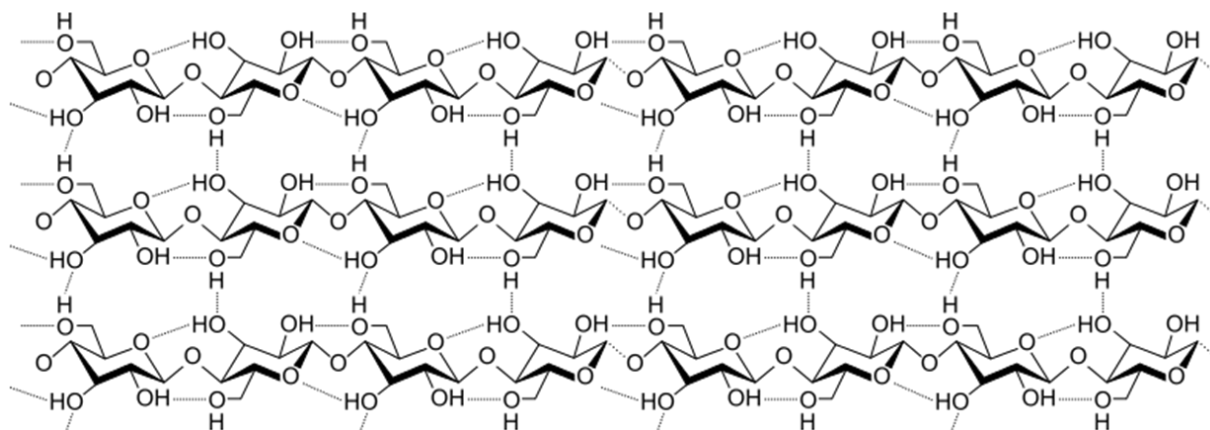
A utilização do colágeno como suporte na imobilização de diferentes enzimas tem sido reportada por diversos estudos (LU et al., 2007; SONG et al., 2011; CHEN et al., 2011). Por conter abundantes grupos funcionais como -OH, -COOH, -CONH₂ e -NH₂, a estrutura do colágeno pode ser modificada para ativar esses grupamentos, melhorando sua interação com outras proteínas. Além disso, o colágeno possui a capacidade de reagir com diversos íons metálicos, tais como Fe (III), Al (III) e Zr (IV). A imobilização destes íons metálicos é a primeira etapa de uma das possíveis modificações do colágeno. Essa reação é realizada para aumentar a estabilidade e a afinidade da enzima, que ocorre devido à interação quelante entre o íon imobilizado e a enzima (EVANS et al., 1987).

3.3.2.3 Celulose microcristalina

A celulose é um polímero semicristalino com ligações glicosídicas β -1,4 entre unidades D-glicopirranose (Figura 6), isto é, apresenta regiões cristalinas altamente organizadas e também

regiões amorfas, onde as cadeias estão agrupadas de maneira mais irregular. Isso ocorre devido ao empacotamento das cadeias, que se unem pela rede de ligações de hidrogênio inter e intramoleculares e dos muitos grupos hidroxílicos presentes nas cadeias (HUANG et al., 2011).

Figura 6 - Estrutura polimérica da celulose.



O processo de obtenção da celulose microcristalina ocorre a partir da hidrólise ácida da polpa de madeira. Neste processo, íons hidrônios permeiam as cadeias de celulose promovendo a clivagem hidrolítica das ligações glicosídicas. Em condições controladas, essas reações liberam microcristais celulósicos estáveis, os quais são compostos por cadeias de celulose em um arranjo linear rígido (CANDANEDO et al., 2005; HENRIKSSON et al., 2007).

A celulose microcristalina é abundante e barata, com excelentes propriedades físicas para utilização em aplicações alimentares, farmacêuticas e químicas. A afinidade bioespecífica dos domínios de ligação da celulose oferece uma série de vantagens de interesse industrial, tais como a formação de ligações não covalentes, evitando a necessidade do uso de outros compostos na imobilização, e a elevada afinidade de seus domínios combinada com a tolerância de dessorção, permitindo a imobilização essencialmente irreversível (BORASTON et al., 2002; SHOSEYOV et al., 2006).

A nanocelulose é outro derivado de celulose que apresenta diversas vantagens, tais como alta reatividade, renovabilidade, biodegradabilidade. Além disso, possui uma área superficial elevada, o que permite uma grande interação com outros compostos (KLEMM et al., 2011). Sua obtenção vem sendo explorada através de hidrólises ácidas das microfibras de celulose (REDDY e RHIM, 2014) ou hidrólises alcalinas dos polímeros de celulose (SHANKAR e RHIM, 2016). Em função do seu baixo custo e do seu apelo nanotecnológico, este derivado da celulose está emergindo como um dos materiais sustentáveis para futuras aplicações industriais

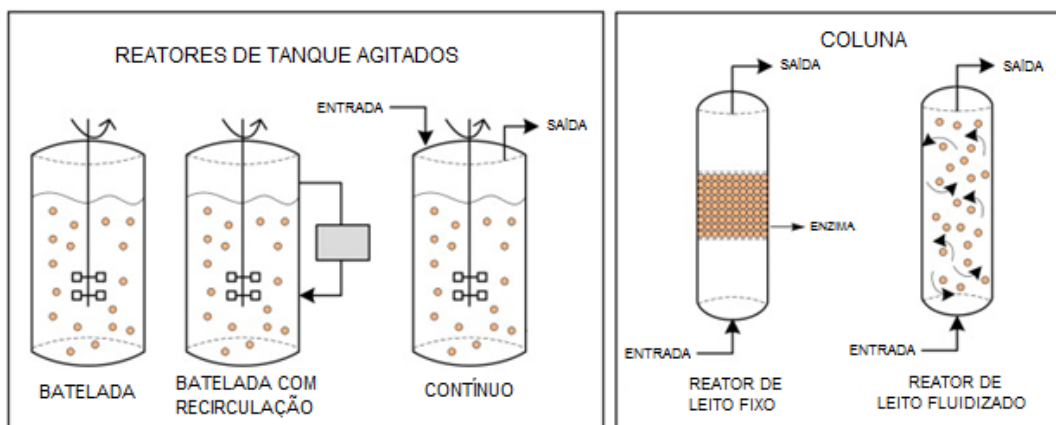
(LIU e CHEN, 2016). Kotel'nikova et al. (2007) imobilizaram as enzimas tripsina e α -quimotripsina em uma matriz de celulose microcristalina utilizando a técnica de adsorção. Os autores verificaram que ligações estáveis entre a celulose e as enzimas foram formadas devido à interação dos grupos amino das enzimas com os grupos terminais de aldeído da celulose e com os grupos carboxila da superfície do suporte.

Matrizes de celulose como coadjuvante do suporte também já são usadas para imobilização de enzimas, como reportado no estudo de Rahman et al. (2016). Neste trabalho, uma nova estearase foi clonada, purificada e imobilizada em nanoesferas magnéticas envoltas em celulose microcristalina. Os autores reportaram que após 8 ciclos de reuso a enzima imobilizada mantinha aproximadamente 50% da sua atividade inicial, demonstrando um elevado potencial na área de biotecnologia e processos industriais.

3.4 Reatores enzimáticos

Os processos em reatores são etapas que simulam a aplicação da enzima imobilizada em processos industriais. A seleção de uma configuração adequada de reator é um aspecto importante para o uso em escala industrial de processos biotecnológicos envolvendo enzimas imobilizadas (DENG et al., 2010). Existem quatro principais configurações de reatores enzimáticos descritos na literatura, como representado na Figura 7.

Figura 7 - Representação esquemática dos principais tipos de reatores enzimáticos



Fonte: Adaptado de POPPE et al., 2015.

Podem ser utilizados os reatores de tanque agitado em processos descontínuos ou em bateladas, os reatores de tanque agitado em processos contínuos, os reatores de coluna de leito fixo (em que a enzima imobilizada é empacotada, permanecendo na fase estacionária, enquanto a solução de substrato é bombeada através da coluna), e os reatores de coluna de leito fluidizado

(em que a enzima imobilizada é mantida em suspensão por processos de reciclagem, através do qual a solução de substrato é bombeada) (GUISAN, 2006; KUMAR et al., 2013).

3.4.1 Reator enzimático descontínuo ou em batelada

Os processos enzimáticos em batelada são normalmente conduzidos em reator de tanque agitado, que é o tipo mais simples e de mais fácil execução. Pode ser equipado com dispositivos de medição e controle de temperatura e um sistema de agitação. A recuperação da enzima imobilizada é realizada através da sua separação da solução por meio de centrifugação, filtração ou decantação. Neste tipo de reator é importante considerar uma possível redução gradual de atividade enzimática ao longo das reutilizações, devido à perda da enzima imobilizada nas etapas de limpeza e remontagem da reação. Outra desvantagem é a alta tensão de cisalhamento causada pela agitação mecânica do meio, necessária para a homogeneização (POPPE et al., 2015).

Haider e Husain (2009) estudaram a eficiência da hidrólise da lactose do leite e do soro de queijo empregando a enzima β -galactosidase imobilizada em esferas de alginato de sódio, com e sem o uso de concanavalina A. Comparando os resultados obtidos, os autores verificaram que a β -galactosidase imobilizada na presença de concanavalina A foi mais eficiente na hidrólise da lactose presente no leite (77%) e no soro de queijo (86%) em processos descontínuos, em comparação com a β -galactosidase solúvel encapsulada.

Ansari e Husain (2012) estudaram a imobilização da enzima β -galactosidase de *A. oryzae* no suporte Celite 545 utilizando concanavalina A. A enzima imobilizada foi empregada em reatores descontínuos. Observou-se nestes processos que os derivados que continham concanavalina A, em comparação com a enzima solúvel adsorvida, apresentaram um aumento da eficiência na hidrólise da lactose do leite, de 57 para 67%, e do soro de queijo, de 71 para 75%.

3.4.2 Reator enzimático contínuo

O sistema contínuo apresenta vantagens diretas e indiretas, quando comparado com o sistema de bateladas, tais como maior eficácia no controle dos parâmetros de reação e a mistura de reagentes (ZANIN et al., 2004), menor custo na otimização das condições de reação, maior eficiência energética e menor número de etapas para o isolamento do produto (ITABAIANA et al., 2013). Além disso, o uso de reatores contínuos, principalmente o de leito fixo ou leito fluidizado, aumenta a estabilidade mecânica da enzima imobilizada. Os processos contínuos

podem ser operados por longos períodos de tempo sob condições de estado estacionário reacional (GUISAN, 2006).

Matte et al. (2016) imobilizaram covalentemente a enzima lipase em suporte Immobead. A enzima imobilizada manteve 83% da sua capacidade de conversão inicial após oito ciclos de reutilização em reator de batelada e 63% após 30 dias de operação contínua em reator de leito fixo. Estes resultados sugerem que este sistema imobilizado pode ser utilizado com sucesso no desenvolvimento de compostos para as indústrias de alimentos, cosméticos, e para aplicações farmacêuticas.

Mishra et al. (2016) produziram etanol lignocelulósico em reatores de leito fixo. O microrganismo empregado foi *Saccharomyces cerevisiae* imobilizada por aprisionamento em um sistema de alginato de cálcio. Os derivados contendo *S. cerevisiae* puderam ser usados por até 40 processos de fermentação. Os autores demonstraram que, em escala comercial, esse derivado apresenta um grande potencial para produção de etanol.

Warmerdam et al. (2014) estudaram o potencial de produção de GOS a partir da enzima β -galactosidase de *Bacillus circulans* imobilizada covalentemente em esferas de Eupergit C 250L. Os derivados foram empregados em reatores de leito fixo com processo contínuo. A produtividade da ação enzimática de GOS usando a enzima imobilizada em um reator de leito fixo contínuo foi seis vezes maior do que o de produção de GOS com a enzima livre em processo descontínuo. Dessa forma, como o volume de derivado usado no reator de leito fixo foi muito menor do que se utilizada em processo em batelada, os resultados obtidos pelos autores se apresenta como uma alternativa viável para a produção enzimática de GOS.

4 RESULTADOS

Os resultados deste trabalho estão organizados e apresentados na forma de artigos, sendo estes publicado, submetido ou em preparação. Cada subtítulo deste capítulo corresponde a um destes artigos.

4.1 Modification of Immobead 150 support for protein immobilization: effects on the properties of immobilized *Aspergillus oryzae* β -galactosidase.

4.2 Chelation by collagen in the immobilization of *Aspergillus oryzae* β -galactosidase: a potential biocatalyst to hydrolyze lactose by batch processes.

4.3 Hydrolysis of lactose by *Kluyveromyces lactis* β -galactosidase immobilized on Immobead: catalytic and operational characterization.

4.4 Efeito da modificação química do colágeno nas propriedades estruturais e nas características catalíticas da enzima β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* imobilizada.

4.5 Nanocelulose ligada a nanopartículas magnéticas: suporte promissor para a imobilização de β -galactosidasas.

4.1 Modification of Immobead 150 support for protein immobilization: effects on the properties of immobilized *Aspergillus oryzae* β -galactosidase. Artigo submetido ao periódico *Biotechnology Progress* - BTPR-17-0340.R1 em Outubro de 2017.

Modification of Immobead 150 support for protein immobilization: effects on the properties of immobilized *Aspergillus oryzae* β -galactosidase

Adriano Gennari¹, Francielle Herrmann Mobayed¹, Ruan da Silva Rafael¹, Rafael C. Rodrigues², Raul Antonio Sperotto¹, Giandra Volpato³, Claucia Fernanda Volken de Souza^{1*}

¹ Laboratório de Biotecnologia de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade do Vale do Taquari - Univates, Lajeado, RS, Brazil.

² Biotechnology, Bioprocess and Biocatalysis Group, Institute of Food Science and Technology, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

³ Curso de Biotecnologia, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul - IFRS, Campus Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil.

* Corresponding Author. Laboratório de Biotecnologia de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade do Vale do Taquari - Univates, Av. Avelino Tallini, 171, ZC 95914-014, Lajeado, RS, Brazil. Phone: +55 51 3714 7000. Fax: +55 51 3714 7001. E-mail address: claucia@univates.br

Abstract

We studied the modification of Immobead 150 support with glutaraldehyde (Immobead-Glu) or acid solution (Immobead-Ac) for enzyme immobilization by covalent attachment or ionic adsorption, respectively, comparing these two types of immobilization with the epoxy groups from the support. We used *Aspergillus oryzae* β -galactosidase (Gal) as a protein model, immobilizing it on unmodified (epoxy groups, Immobead-Epx) and modified supports. Immobilization yield and efficiency were tested as a function of protein loading (10 to 500 mg.g⁻¹ of support). Gal was efficiently immobilized on the Immobeads presenting an immobilization efficiency superior to 75 % for almost all supports and protein loads. Immobilization yields significantly decreased when protein loadings were higher than 100 mg.g⁻¹ of support. Gal immobilized on Immobead-Glu and Immobead-Ac retained approximately 60 % of its initial activity after 90 days of storage at 4 °C. The three immobilized Gal derivatives had higher half-lives than the soluble enzyme at 65, 68, 70, and 73 °C. All of the preparations were operationally stable when tested in lactose solution, whey permeate, cheese whey, and skim milk and retained approximately 50 % of their initial activity after 20 cycles of hydrolyzing lactose solution. The modification of the support with glutaraldehyde provides a derivative with more stability during cycling in cheese whey than derivatives of the other supports. Our results suggest that the Immobead 150 is a promising support for the immobilization of Gal.

Keywords: support modification; Immobead 150; enzyme immobilization; β -galactosidase; whey hydrolysis.

Introduction

Industrial processes require enzymes that are highly productive and stable under specific physical, chemical and biological conditions. The solubility of free enzymes makes their large-scale use relatively costly since their recovery from solutions containing substrate, products and other components is difficult.^{1,2} Enzyme immobilization is widely used for obtaining reusable enzyme derivatives because this approach reduces their high cost, which is also associated with their production and purification. This process can increase the stability of enzymes against denaturing factors such as pH, temperature, ionic strength, chemical denaturants, and proteases.^{1,3} Several immobilization techniques such as physical adsorption, entrapment, and covalent binding have been used on different supports to allow the application of these enzymes to many industrial.^{1,4-6}

Commercial epoxy supports, such as Eupergit C[®], Sepabeads[®], and Immobead 150[®], have become useful for enzyme immobilization due to the combination of their physical and chemical structures.⁷ Epoxy groups can react with different groups from the protein surface, including thiols (from Cys), primary amino groups (terminal amino and those from the side chain of Lys), hydroxyl (mainly from the phenol chain of Tyr), imidazol (from His), and also with carboxylic acids (side chain of Asp and Glu, carboxyl terminal groups of the enzyme).⁸ The mechanism of enzyme immobilization and stabilization in epoxy supports has been proposed as follows: firstly, hydrophobic adsorption or covalent bond at neutral pH values and low temperatures; thus, the pH is raised (to pH 9 or 10) to increase the enzyme-support reactivity, allowing an intense multipoint covalent attachment, getting a high stabilization of the enzymes via this immobilization protocol.^{9,10}

Among the commercial epoxy supports, Eupergit C[®] consists of macroporous beads with a diameter of 100-250 μm and exhibits a high density of oxirane groups (600 $\mu\text{mol/g}$ of support). This support is made by the copolymerization of N,N'-methylene-bis-(methacrylamide), glycidyl methacrylate, allyl glycidyl ether and methacrylamide.¹¹ Sepabeads[®] are a polymethylacrylate-based resin activated with epoxide functional groups and exhibits a particle size of approximately 150 μm and a density of groups equivalent to that of Eupergit C.⁹ Immobead 150[®], formed from methacrylate polymers, has a pore size of 2-50 nm and also a high density of surface groups.

Immobead (Immobead-Epx) is useful for adsorbing or forming covalent and multipoint covalent linkages with enzymes, because of the high surface area that results from its mesoporous nature, and the possibility of modifying the epoxy groups on its surface.^{1,12,13}

Immobead 150 has been employed for the immobilization of formate dehydrogenase, lipase, and α -amylase.¹⁴⁻¹⁸ Several compounds have been used for the modification or activation of commercial epoxy supports. Each compound provides its own characteristics to the material, such as the crosslinking of glutaraldehyde; oxidation caused by acid solutions; activation of carboxyl groups with 1,1-(3-dimethylaminopropyl)-ethyl-carbodiimide hydrochloride, followed by a reaction (under slightly acidic conditions) of nucleophilic amino groups of proteins on the protonated carbodiimide; and addition of amine groups using ethylenediamine.¹⁹⁻²⁴ However, few manuscripts reported the modification of epoxy groups on Immobead 150, and the use of acid solutions in this manner has not been described. Moreover, the use of modified or unmodified Immobead 150 in β -galactosidase immobilization has not been published.

β -Galactosidase catalyzes conversion of lactose to monosaccharides through the hydrolysis of the terminal β -glycosidic bonds.²⁵ The most important industrial application of β -galactosidases is in dairy industry to produce low-lactose products. Furthermore, β -galactosidases are used to reduce problems associated with whey disposal and with lactose crystallization in frozen concentrated desserts and to improve the sweetness, solubility, and flavor of dairy products.^{26,27} Due to high interest, β -galactosidases have been immobilized in many supports such as agarose,^{28,29} chitosan,^{30,31} nanomaterials,^{20,32} and membranes/films.^{33,34} In these cases, several techniques such as adsorption, crosslinking or covalent attachment were used to immobilize β -galactosidases.

In this work, we studied the modification of the epoxy groups of Immobead 150 supports by using glutaraldehyde (Immobead-Glu) or an acid solution (Immobead-Ac) to obtain different groups for enzyme immobilization (Figure 1). We used the β -galactosidase from *Aspergillus oryzae* as a protein model. The supports, Immobead-Epx, Immobead-Glu and Immobead-Ac, were tested with various protein loadings. The immobilized preparations were also characterized and compared to the soluble form of the enzyme with regard to their pH values and temperatures for optimal activity, storage stability, kinetic parameters, thermal stability, and operational stability in lactose hydrolysis.

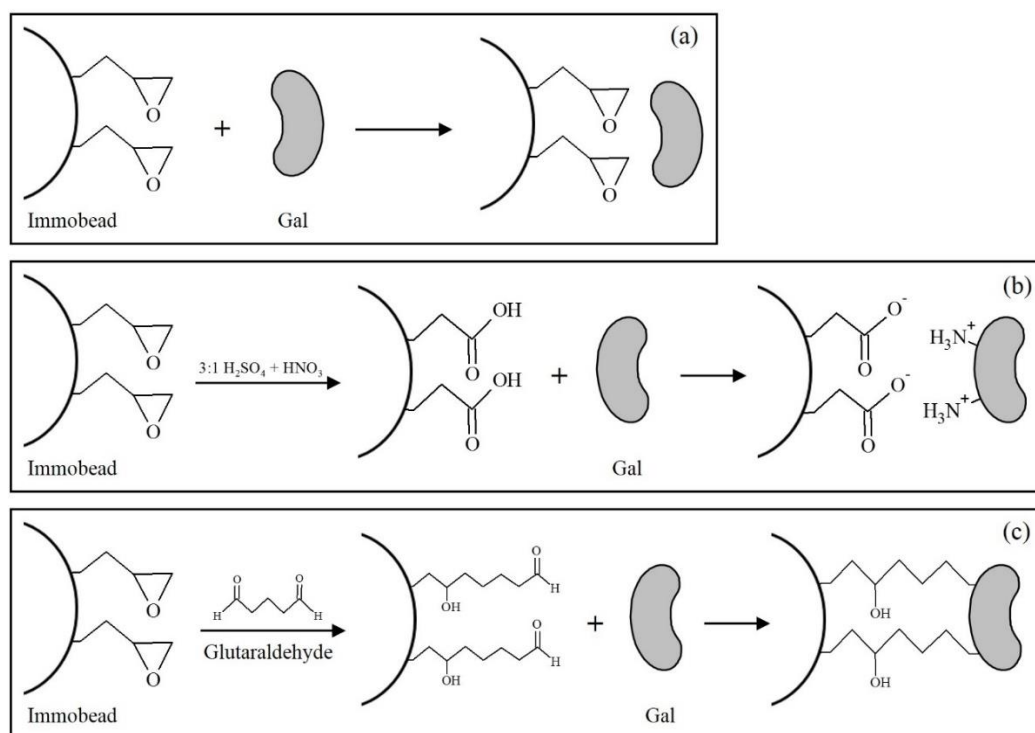


Figure 1. Scheme of β -galactosidase immobilization on Immobead by (a) hydrophobic adsorption, (b) electrostatic interaction, and (c) crosslinking.

Materials and Methods

Materials

β -Galactosidase from *Aspergillus oryzae* (Gal) was donated by Prozyn Company (São Paulo, Brazil). Powdered skim milk and powdered cheese whey were purchased from Brazil Foods S.A. (Rio Grande do Sul, Brazil). Powdered whey permeate was provided by Arla Foods (Córdoba, Argentina). The enzymatic kit for glucose determination was acquired from Labtest (Minas Gerais, Brazil). The support Immobead 150, ortho-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside (ONPG), and other chemicals were purchased from Sigma Aldrich Co. (St. Louis, USA). All of the other reagents were of analytical grade.

β -D-galactosidase activity assay and protein quantification

The activity of the free and immobilized β -galactosidase was determined spectrophotometrically using ONPG as a substrate. The reaction was conducted by mixing 50 μL of the enzyme solution or derivative suspension with 450 μL of the substrate solution (18 mM ONPG in 100 mM sodium acetate buffer, pH 4.5) for 2 min at 55 $^{\circ}\text{C}$ in a water bath while stirring. The reaction was stopped by the addition of 1.5 mL of a sodium carbonate solution (2 M, pH 9.8). The absorbance was measured at 415 nm. One β -galactosidase unit was defined as

the amount of enzyme that releases 1 μmol of ortho-nitrophenol ($\epsilon_m = 4500 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) per minute at the defined assay conditions. The protein concentration of the enzyme solutions was determined using the Bradford method with a Bio-Rad[®] protein dye (St. Louis, MO, USA) reagent concentrate and bovine serum albumin as the standard protein.³⁵

Preparation of the modified supports

Immobead 150 was modified with two different methods. First, the support was modified with glutaraldehyde (Immobead-Glu) according to a method described by Mariotti et al.³⁶ Briefly, 50 mg of Immobead 150 was mixed with 4 mL of a glutaraldehyde solution (5 %, v/v) at pH 3.1 and stirred for 8 h. Immobead 150 was also modified with an acid solution (Immobead-Ac) following the method proposed by Mubarak et al.³⁷ with some modifications. For this process, 50 mg of the support was suspended with 4 mL of an acid solution (3:1, v/v) of H_2SO_4 1 M and HNO_3 1 M and stirred for 8 h. The treated supports were sequentially and thoroughly washed with ultra-pure water to remove traces of reagents and then with acetate buffer (100 mM, pH 4.5). The modified supports were separated from the reagents by centrifugation at $2,370 \times g$ and 4 °C for 5 min. The epoxy groups were quantified according to Sundberg and Porath³⁸ and it was confirmed that all epoxy groups were modified.

β -galactosidase immobilization

β -Galactosidase was immobilized on unmodified (Immobead-Epx) and modified supports (Immobead-Glu and Immobead-Ac). The immobilization processes were conducted by adding 3 mL of β -galactosidase solution (10-500 mg of protein per gram of support) prepared in acetate buffer (100 mM, pH 4.5) on 50 mg of each support. The mixtures were incubated under stirring (150 rpm at 30 °C) for 24 h. During the process, supernatant and suspension samples were collected periodically to monitor the enzyme activity and protein content. Immobilized β -galactosidase was separated by centrifugation at $2,370 \times g$ and 4 °C for 5 min. Then, the derivatives (Immobead-Glu-Gal, Immobead-Ac-Gal, and Immobead-Epx-Gal) were washed twice with acetate buffer (100 mM, pH 4.5). The immobilization yield and immobilization efficiency were calculated according to Sheldon and Van Pelt.⁶

All experiments and analyses were performed in triplicate. The statistical evaluation of the immobilization yield and immobilization efficiency was performed through one-way analyses of variance (ANOVAs), and the significance of the model was verified by the F-test.

In the significance models, the averages were compared with a Tukey test at a significance level of 95 % ($p < 0.05$) using the BioEstat 5.0 software.

Characterization of free and immobilized β -galactosidases

The optimal pH values for free and immobilized β -galactosidases were determined by measuring the activity at 55 °C at pH values ranging from 4.0 to 8.0. The buffers used were acetate (100 mM, pH 4.0 to 6.0) and phosphate (100 mM, pH 6.5 to 8.0). To study the effect of the temperature, it was varied from 4.0 to 75 °C while fixing the pH at 4.5. The specific activity of free or immobilized β -galactosidases at an optimal pH or temperature value was considered as 100 % activity, and the relative activity at each tested pH and temperature, separately, was calculated as a percentage of the 100 % activity.

In addition, free and immobilized β -galactosidases were stored in acetate buffer (100 mM and pH 4.5) at 4 and 25 °C for 3 months, and the residual activity over time was measured to evaluate their storage stability. The activity determined on the first day was taken as the control (100 %) for the calculation of the residual activity.

Kinetic parameters of free and immobilized β -galactosidases were determined by changing the ONPG concentration (3 to 18 mM) at 100 rpm. The K_M (Michaelis constant) and V_{max} (maximum rate of the reaction) values were determined using the Michaelis-Menten model and a Lineweaver-Burk linearization according to Equation 1:

$$\frac{1}{V} = \frac{K_M}{V_{max}} \times \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \quad (1)$$

where V (mM.min⁻¹) is the catalytic reaction rate, V_{max} (mM.min⁻¹) is the maximum velocity, $[S]$ is the substrate concentration (mM), and K_M is the Michaelis constant (mM).

The turnover number (k_{cat}) (min⁻¹) of free and immobilized β -galactosidases was calculated according to Equation 2:

$$k_{cat} = \frac{V_{max}}{[E_T]} \quad (2)$$

where V_{max} (mM.min⁻¹) is the maximum velocity and $[E_T]$ is the total concentration (mM) of enzymes in the reaction medium.

The catalytic specificity constant (min⁻¹.mM⁻¹) of free and immobilized β -galactosidases was calculated as the ratio between the turnover number (k_{cat}) (min⁻¹) and the Michaelis constant (K_M) (mM).

The thermal stability of the free and immobilized β -galactosidases was determined by incubating the samples at 65, 68, 70 and 73 °C and measuring the residual β -galactosidase

activity over time. The thermodynamic parameters were calculated according to a simplified deactivation model described in the literature.³⁹

The energy of activation (E_a) for the inactivation process was calculated by using nonlinear regression and considering the Arrhenius plot (Equation 3):

$$k = A \cdot e^{\frac{E_a}{R \cdot T}} \quad (3)$$

where k (min^{-1}) is the kinetic deactivation constant, A (min^{-1}) is the pre-exponential factor, E_a (J mol^{-1}) is the energy of activation, R ($8.314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$) is the universal gas constant, and T (K) is the temperature.

The half-life ($t_{1/2}$) of the enzyme is defined as the time required for the enzyme to lose half of its initial activity. The half-life was estimated using Equation 4:

$$t_{1/2} = \ln 2/k \quad (4)$$

where $t_{1/2}$ (min) is the half-life and k (min^{-1}) is the kinetic deactivation constant.

The stabilization factor (SF) at a specific temperature was calculated by dividing the half-life of each immobilized β -galactosidase by the half-life of free β -galactosidase.

Gibb's free energy of thermal inactivation (ΔG) was calculated from the first-order rate constant of the inactivation process at different temperatures and using Equation 5:

$$\Delta G = -R \cdot T \cdot \ln \left(\frac{k \cdot h}{k_B \cdot T} \right) \quad (5)$$

where R ($8.314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$) is the universal gas constant, T (K) is the temperature, k (min^{-1}) is the kinetic deactivation constant, h ($6.6262 \times 10^{-34} \text{ J.s}$) is the Planck constant, and k_B ($1.3806 \times 10^{-23} \text{ J.K}^{-1}$) is the Boltzmann constant.

The enthalpy (ΔH) was calculated from the energy of activation ($\Delta H = E_a - RT$) and the entropy (ΔS) from enthalpy and Gibb's free energy ($T\Delta S = \Delta H - \Delta G$).

Reusability of the immobilized β -galactosidase

The reusability of the immobilized β -galactosidase was determined by the hydrolysis of 10 mL of a lactose solution, whey permeate, cheese whey, and skim milk (all reconstituted to 5 % w/v of lactose) and using 100 mg of the immobilized preparation at 4 °C and 150 rpm for 30 min. At the end of each cycle, the immobilized enzyme was collected by centrifugation ($1,000 \times g$, 3 min, 4 °C), washed with acetate buffer (100 mM, pH 4.5) and placed on fresh substrate for the next cycle. In addition, after each reaction, the immobilized enzyme was collected to determine the residual activity using ONPG as the substrate. The residual activity of each derivative after the first cycle was taken as 100 % activity. The supernatant of the solution was also collected after each reaction to determine the percentage of lactose hydrolysis

by the formation of glucose with a glucose oxidase kit. The degree of hydrolysis of each derivative after the first cycle was defined as 100 % hydrolysis. All experiments and analyses were performed in triplicate.

Results and discussion

Enzyme immobilization

Immobead 150 was modified with a glutaraldehyde and acid solution and used for the immobilization of β -galactosidase. Initially, the protein load for immobilization was tested for three supports, and the results for immobilization yields and efficiencies are shown in Table 1. It was possible to efficiently immobilize the *A. oryzae* β -galactosidase on both unmodified and modified Immobead. In all of the matrices, increased protein loads reduced immobilization yield and efficiency. Nevertheless, the efficiency for Immobead-Glu was superior, especially at high protein loads. Moreover, for the three immobilization protocols studied, there was no significant difference ($p < 0.05$) between the immobilization yield when the protein loadings were 10 to 100 mg of protein/g of support. With respect to efficiency, the values in almost all of the tested loads were higher than 75 %. The reduction of the efficiency at the highest tested protein concentrations can be explained by the fact that excessive protein loadings likely cause agglomeration of the enzyme molecules attached to the surface of the supports.⁴⁰ Madalozzo et al.¹⁶ studied the immobilization of the recombinant lipase by adsorption on Accurel MP-1000 and by covalent bonding on Immobead 150. Similar to the present work, the authors verified that among protein loadings of 50 to 400 mg.g⁻¹ of support, the protein loading of 100 mg.g⁻¹ showed the best immobilization parameters on the Immobead 150.

The differences observed (Table 1) among the treatments (Immobead-Glu, Immobead-Ac, and Immobead-Epx) with the same protein load can be attributed to the nature of the interactions of the enzyme with the support. The higher values of the yields of Immobead-Glu-Gal can be explained by a better stabilization of β -galactosidase molecules and by the occurrence of intermolecular crosslinking between lysine residues from β -galactosidase with the aldehyde group of polymeric glutaraldehyde.⁴¹ Immobead-Glu may interact with a protein in three different ways: hydrophobic, electrostatic and covalent.²³ Glutaraldehyde reacts reversibly with amino groups over a wide pH range ($\text{pH} \geq 3.0$), and lysyl amines are present in their unprotonated form at lower pH values, which drives the acid-base equilibrium of these groups to deprotonation for further reaction.⁴² The conditions that we used in this treatment were those used to covalently attachment of the enzyme with the carrier.

Table 1. Effect of protein loading on the immobilization of β -galactosidase on Immobead 150 and modified by the different treatments.

Protein load (mg.g ⁻¹ of support)	Immobead-Epx-Gal		Immobead-Ac-Gal		Immobead-Glu-Gal	
	Yield (%)	Efficiency (%)	Yield (%)	Efficiency (%)	Yield (%)	Efficiency (%)
10	78.21 \pm 4.37 ^{A, a}	89.56 \pm 3.44 ^{B, a}	71.79 \pm 6.70 ^{A, a}	97.16 \pm 2.08 ^{AB, a}	87.82 \pm 5.38 ^{A, a}	97.70 \pm 1.73 ^{A, a}
20	76.62 \pm 2.10 ^{AB, a}	83.77 \pm 6.81 ^{A, ab}	66.00 \pm 5.99 ^{B, a}	91.48 \pm 5.80 ^{A, a}	90.68 \pm 4.82 ^{A, a}	93.55 \pm 6.27 ^{A, a}
30	74.57 \pm 5.92 ^{AB, a}	87.08 \pm 5.75 ^{A, ab}	62.27 \pm 7.75 ^{B, a}	95.16 \pm 4.21 ^{A, a}	87.01 \pm 4.30 ^{A, a}	98.18 \pm 1.13 ^{A, a}
50	72.36 \pm 3.00 ^{AB, a}	84.65 \pm 5.01 ^{A, ab}	61.43 \pm 6.36 ^{B, a}	90.01 \pm 3.69 ^{A, a}	81.31 \pm 1.87 ^{A, a}	94.06 \pm 3.26 ^{A, a}
100	78.48 \pm 2.75 ^{A, a}	84.31 \pm 3.31 ^{A, ab}	63.36 \pm 5.90 ^{B, a}	89.29 \pm 6.34 ^{A, a}	88.73 \pm 2.08 ^{A, a}	93.56 \pm 4.71 ^{A, a}
200	51.84 \pm 5.02 ^{A, b}	73.68 \pm 6.25 ^{B, ab}	34.95 \pm 1.83 ^{B, b}	81.93 \pm 4.74 ^{AB, a}	56.55 \pm 2.39 ^{A, b}	90.88 \pm 2.99 ^{A, a}
300	48.75 \pm 4.78 ^{A, b}	76.61 \pm 4.28 ^{B, ab}	32.80 \pm 2.68 ^{B, b}	81.15 \pm 6.25 ^{AB, a}	50.71 \pm 2.03 ^{A, b}	91.37 \pm 2.97 ^{A, a}
500	45.24 \pm 4.86 ^{A, b}	70.95 \pm 5.21 ^{B, b}	32.55 \pm 2.71 ^{B, b}	82.44 \pm 4.53 ^{AB, a}	48.31 \pm 1.80 ^{A, b}	89.16 \pm 5.27 ^{A, a}

Each value represents the mean of three independent experiments performed in triplicate with the average standard deviation. The same uppercase letter indicates that the immobilization parameter is statistically equal ($p < 0.05$) for the different derivatives. The same lowercase letter indicates that the immobilization parameter is statistically equal ($p < 0.05$) for the different protein loads for each derivative.

The acid solution used in the oxidation of the surface groups of the Immobead introduced carboxyl groups. This reaction was a nucleophilic attack on the epoxy groups of Immobead using acidic conditions; the attack position is thus controlled by steric effects and the stability of the carbocation.^{37,43} In this protocol, the chemical interaction observed between the -NH₂ groups of the β -galactosidase and the -COOH of the support occurred by electrostatic interactions. One of the possible reasons for the reduction of the amount of immobilized enzyme in Immobead-Ac-Gal when compared with the adsorption method (Immobead-Gal) may have been the limited carboxyl groups introduced in the Immobead surface; once in the unmodified support, a large surface area and larger number of surface groups (epoxides) are available for β -galactosidase adsorption.

Characterization of free and immobilized β -galactosidases

Sensitivity to changes in environmental conditions is one of the major limitations of utilizing enzymes as catalysts in chemical reactions (in many commercial applications). The activity of the free and immobilized β -galactosidases as a function of pH was determined (Figure 2a). In this study, pH values from 4.0 to 8.0 were selected to cover the range of conditions that might be found in commercial food products. Free β -galactosidase presented an optimal pH at 5.0, while for all immobilized forms, this value was displaced to pH 6.0. The enzyme activity decreased markedly when the pH was higher than 6.5. This effect can be attributed to changes in the three-dimensional structure of the enzyme when the pH is altered, which leads to alterations in the morphology and surface chemistry of the active site.⁴⁴ Similar behavior was reported by Zhang et al.⁴⁵, who worked with β -galactosidase immobilized onto magnetic beads, and their results showed an increase in pH optimal values from 7.7 to 8.3 after the immobilization.

In the same sense, the effect of temperature on the catalytic activity of β -galactosidase is shown in Figure 2b. The activities of free and immobilized β -galactosidases increased as the temperature was increased, and the maximum values were found at 55 °C for the free enzyme and 60 °C for Immobead-Ac-Gal, Immobead-Glu-Gal and Immobead-Epx-Gal. It is worth noting that at 70 °C, the soluble enzyme lost 40 % of its activity but the immobilized β -galactosidase retained more than 95 % of its initial activity for all of the immobilization protocols. These results are reflected in the conformational stability attained by the enzyme as a result of the hydrophobic nature of Immobead, which may change the dielectric constant of

the microenvironment by modifying the acid constants of basic or acid groups of immobilized enzyme.^{46,47}

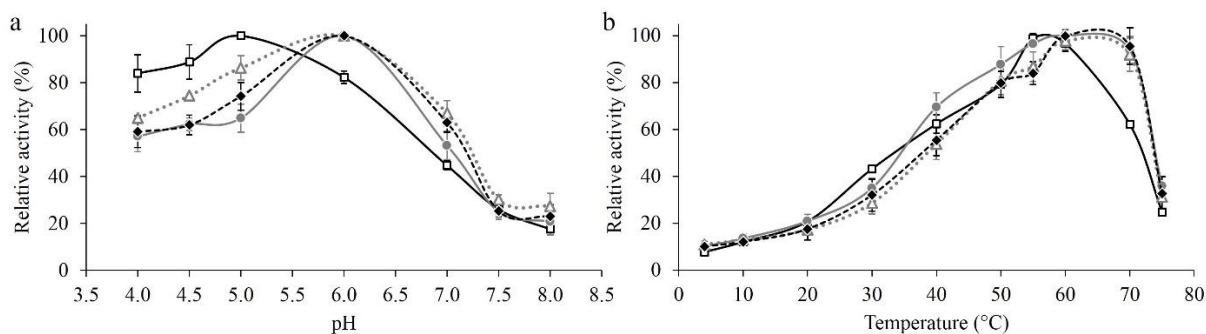


Figure 2. Effects of pH (a) and temperature (b) on the activity of free and immobilized β -galactosidases. Relative activity refers to the activity/maximum activity. (□) Free Gal; (●) Immobead-Epx-Gal; (△) Immobead-Ac-Gal; (◆) Immobead-Glu-Gal.

For industrial applications, the loss of enzyme activity during storage and operation is an important factor.⁴⁸ The stability of the immobilized enzyme was investigated by maintaining the enzyme in acetate buffer (100 mM, pH 4.5) under two different conditions (4 and 25 °C). After 90 days of storage at 4 °C, the Immobead-Epx-Gal retained 50 % of its activity, while Immobead-Ac-Gal and Immobead-Glu-Gal retained approximately 60 %. These results indicate that the bonds between the free amino groups of *A. oryzae* β -galactosidase and the groups created on the Immobead 150 by the modification process with glutaraldehyde or with the acid solution increased the storage stability of the enzyme at 4 °C. At 25 °C, Immobead-Epx-Gal, Immobead-Ac-Gal, and Immobead-Glu-Gal showed a decrease in the enzyme activity during storage, which was 10 % lower than at 4 °C.

Table 2 shows the kinetic parameters of free and immobilized β -galactosidases. The K_M increased, while the V_{max} decreased, as a result of the immobilization processes. The k_{cat} values showed the same tendency as the V_{max} values. The reduction of the affinity observed in Immobead-Epx-Gal could be caused by the steric hindrance of the derivative generated from the interfacial adsorption of β -galactosidase on the Immobead.¹ In addition, the simple interaction between the enzyme and support allowed the easy diffusion of the derivative that generated the highest V_{max} of the catalysis between the immobilized β -galactosidases. The ionic interaction in Immobead-Ac-Gal resulted in an approximately 2-fold reduction in the K_M values, which could be explained by the variation of microenvironment in the immobilized enzyme.⁴⁴ In the crosslinking process for Immobead-Glu-Gal, the glutaraldehyde acted as a spacer and

allowed a greater accessibility of the substrate to the immobilized enzyme but also caused a higher reduction in reaction velocity.⁴⁹

Table 2. Kinetic parameters of the free and immobilized β -galactosidases.

Derivative	K_M (mM)	V_{max} (mM.min ⁻¹)	k_{cat} (min ⁻¹)	Catalytic specificity constant (min ⁻¹ .mM ⁻¹)
Free Gal	9.98 \pm 0.69	103.67 \pm 4.14	925.33	92.73
Immobead-Epx-Gal	26.49 \pm 0.41	50.01 \pm 0.50	568.70	21.47
Immobead-Ac-Gal	19.80 \pm 2.42	33.34 \pm 2.76	469.67	23.72
Immobead-Glu-Gal	24.38 \pm 1.66	29.65 \pm 3.96	298.22	12.23

Table 3 shows the kinetic parameters of β -galactosidase immobilized in different materials. Pessela et al.⁵⁰, Torres et al.⁵¹, Ansari et al.³² and Ansari and Husain⁵² observed the same behavior in relation to K_M and V_{max} . According to Matsuno et al.⁵³, mass transfer resistance and electrostatic and steric effects are the probable reason for an increase in the Michaelis constant after immobilization. The reduction in the K_M can be due to the uneven surface of the support and also attributed to diffusion effects caused by the high concentration of protein that was immobilized.⁵⁴ The results obtained for V_{max} demonstrate that the immobilization process of β -galactosidase on the Immobead reduced the accessibility of the substrate to the enzyme active site and/or its ability to undergo conformational changes that are intrinsic to the enzyme-substrate interaction.

Table 4 shows the results of the thermal inactivation parameters of free and immobilized β -galactosidases. The $t_{1/2}$ values decreased with increased temperature. These results show greater thermal stability for the immobilized β -galactosidase on the Immobead, mainly in the support modified with glutaraldehyde. The enhanced thermal stability of β -galactosidase when immobilized on the Immobead may be attributed to a decrease in the protein-protein interactions and to a decrease in the vibration intensity of the macromolecules when subjected to high temperature.⁵⁵ Furthermore, the nature of the bonds formed between the enzyme and the support are a key factor to enhance the thermal stability of the enzymes.⁵⁶ Results from the present work agreed with those of Alagoz et al.¹⁴, who immobilized formate dehydrogenase on the supports glyoxyl silica, glyoxyl agarose, and aldehyde-functionalized Immobead, resulting in higher half-lives in the immobilized biocatalysts than the free enzymes.

When the ΔG values of free and immobilized β -galactosidases (Table 5) were compared, it was apparent that the Gibbs free energy increased at all tested temperatures after immobilization, showing that the enzyme is in a high-energy state. This finding indicates that the susceptibility to denaturation was reduced in the derivatives.⁵⁷ Generally, the decrease observed in the ΔG values of *A. oryzae* β -galactosidase with increasing temperatures can be related to the reduction in the availability of the reactive sites due to denaturation and changes in the initial conformation of the enzyme.⁵⁸ For the ΔH of Immobead-Epx-Gal, Immobead-Ac-Gal, and Immobead-Glu-Gal, no difference was observed with the increase in temperature, which indicates that the enthalpy for *A. oryzae* β -galactosidase immobilized on Immobead is not dependent on the temperature within the range studied. The ΔS value from the free and immobilized β -galactosidases increased with increased temperature, indicating that the system disorder increased as the enzyme underwent denaturation. The obtained negative values of entropy probably indicate that the rate-limiting step during thermal deactivation, under the studied conditions, involves the aggregation reaction of partially unfolded enzyme molecules.⁵⁹ Concerning the E_a values, only the Immobead-Ac-Gal process resulted in the reduction of this thermodynamic parameter. Thus, the other derivatives presented a higher propensity for the proteins to maintain the native conformation.⁶⁰

Table 3. Kinetic parameters of β -galactosidase immobilized in different supports.

Derivatives	Kinetic parameters		Reference
	K_M (mM)	V_{max} (IU/mg)	
Free enzyme	3.1	48.00	Pessela et al. ⁵⁰
Sepabeads-IDA-Co	7.7	45.00	
Sepabeads-boronate	6.6	47.00	
	K_M (mM)	V_{max} ($\mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$)	Torres et al. ⁵¹
Free enzyme	12	1.68	
Eupergit C	24	1.28	
Sepabeads EP	29	1.11	
	K_M (mM)	V_{max} ($\text{mM}\cdot\text{min}^{-1}$)	Ansari et al. ³²
Free enzyme	2.45	0.52	
Con A-Celite	4.96	0.46	
Crosslinked Con A-Celite	5.58	0.38	
	K_M (mM)	V_{max} ($\text{mM}\cdot\text{min}^{-1}$)	Ansari and Husain ⁵²
Free enzyme	3.56	2.76	
CA-PMMA	3.88	1.93	

CA-PMMA: cellulose acetate-polymethylmethacrylate membrane.

Table 4. Thermal inactivation parameters for free and immobilized β -galactosidases at different temperatures.

Derivative	65 °C			68 °C			70 °C			73 °C		
	k (min ⁻¹)	$t_{1/2}$ (min)	SF	k (min ⁻¹)	$t_{1/2}$ (min)	SF	k (min ⁻¹)	$t_{1/2}$ (min)	SF	k (min ⁻¹)	$t_{1/2}$ (min)	SF
Free Gal	0.1400	4.95	-	0.3383	2.05	-	0.5769	1.20	-	1.0594	0.65	-
Immobead-Epx-Gal	0.0713	9.72	1.96	0.1936	3.58	1.75	0.2973	2.33	1.94	0.5000	1.39	2.12
Immobead-Ac-Gal	0.0975	7.11	1.44	0.2501	2.77	1.35	0.3801	1.82	1.52	0.4455	1.56	2.38
Immobead-Glu-Gal	0.0560	12.38	2.50	0.1901	3.65	1.78	0.2111	3.28	2.73	0.4491	1.54	2.36

SF = Stabilization Factor

Table 5. Thermodynamic parameters for free and immobilized β -galactosidases.

Derivative	E_a	65 °C			68 °C			70 °C			73 °C		
		ΔG	ΔH	ΔS	ΔG	ΔH	ΔS	ΔG	ΔH	ΔS	ΔG	ΔH	ΔS
Free Gal	10.03	100.16	7.22	-274.96	98.58	7.20	-267.96	97.65	7.18	-263.75	96.78	7.16	-259.02
Immobead-Epx-Gal	9.59	102.06	6.78	-281.90	100.16	6.75	-275.92	101.06	6.73	-273.00	98.94	6.71	-266.56
Immobead-Ac-Gal	7.63	101.18	4.82	-285.10	99.43	4.79	-277.54	98.84	4.77	-274.24	99.27	4.75	-273.18
Immobead-Glu-Gal	9.83	102.74	7.02	-283.18	100.21	7.00	-277.35	102.72	6.98	-272.12	99.25	6.96	-266.74

E_a (kJ.mol⁻¹); ΔG (kJ.mol⁻¹); ΔH (kJ.mol⁻¹); ΔS (J.mol⁻¹.K⁻¹).

Reusability of the immobilized β -galactosidase

One of the advantages associated with the industrial application of immobilized enzymes is the possibility of multiple reuses, which improves the overall cost-effectiveness of the process. The reusability of the Immobead-Epx-Gal, Immobead-Ac-Gal, and Immobead-Glu-Gal was evaluated in four substrate solutions: lactose, whey permeate, cheese whey, and skim milk (Figure 3). Both evaluations, i.e., residual activity and hydrolysis degree, exhibited a similar behavior during the reusability cycles. A loss of approximately 50 % of the initial hydrolytic activity after 19 cycles was observed in the hydrolysis of the lactose solution (Figure 3a). In the permeate hydrolysis (Figure 3b), with the exception of Immobead-Ac-Gal, this loss was verified only after the 33rd cycle. Concerning the reusability in cheese whey and skim milk (Figure 3c and 3d, respectively), the reductions of the hydrolytic activity of Immobead-Epx-Gal, Immobead-Ac-Gal, and Immobead-Glu-Gal were more pronounced. It is important to note that galactose and glucose formed during the reaction can act as competitive and noncompetitive inhibitors, respectively, and reduce the reaction rates over time as they accumulate in the reaction medium and contribute to the incomplete hydrolysis of lactose usually observed in the batch process.¹³ In addition, proteins and minerals present in cheese whey and milk may have an inhibitory effect on the β -galactosidase activity.⁶¹ The difference observed in the enzyme performance between the evaluated substrates can be attributed to the stability of the enzyme-support interaction under repeated reactions. As shown in Figure 3, Immobead-Ac-Gal exhibited lower stability in the hydrolysis of the substrates compared to the other derivatives. This effect was probably caused by the salt concentration present in the solutions (whey permeate, cheese whey, and skim milk), which may have interfered with the electrostatic interactions and caused desorption from the carrier.⁶² According to Valerio et al.⁵⁴, the decrease in the activity shown in the final batches is due to progressive decay in the mechanical resistance of the immobilized enzyme, inherent wastes resulting from material transfer, and natural denaturation of the biocatalyst. The reusability of enzyme in this study was superior to that observed by Wahba⁶³; when they immobilized β -galactosidase in calcium pectinate beads activated with chitosan and glutaraldehyde, 59 % of the initial activity remained after the 13th run. This decline in the relative activity was attributed to the deformation of the active site of the enzyme after repeatedly reacting with substrate.

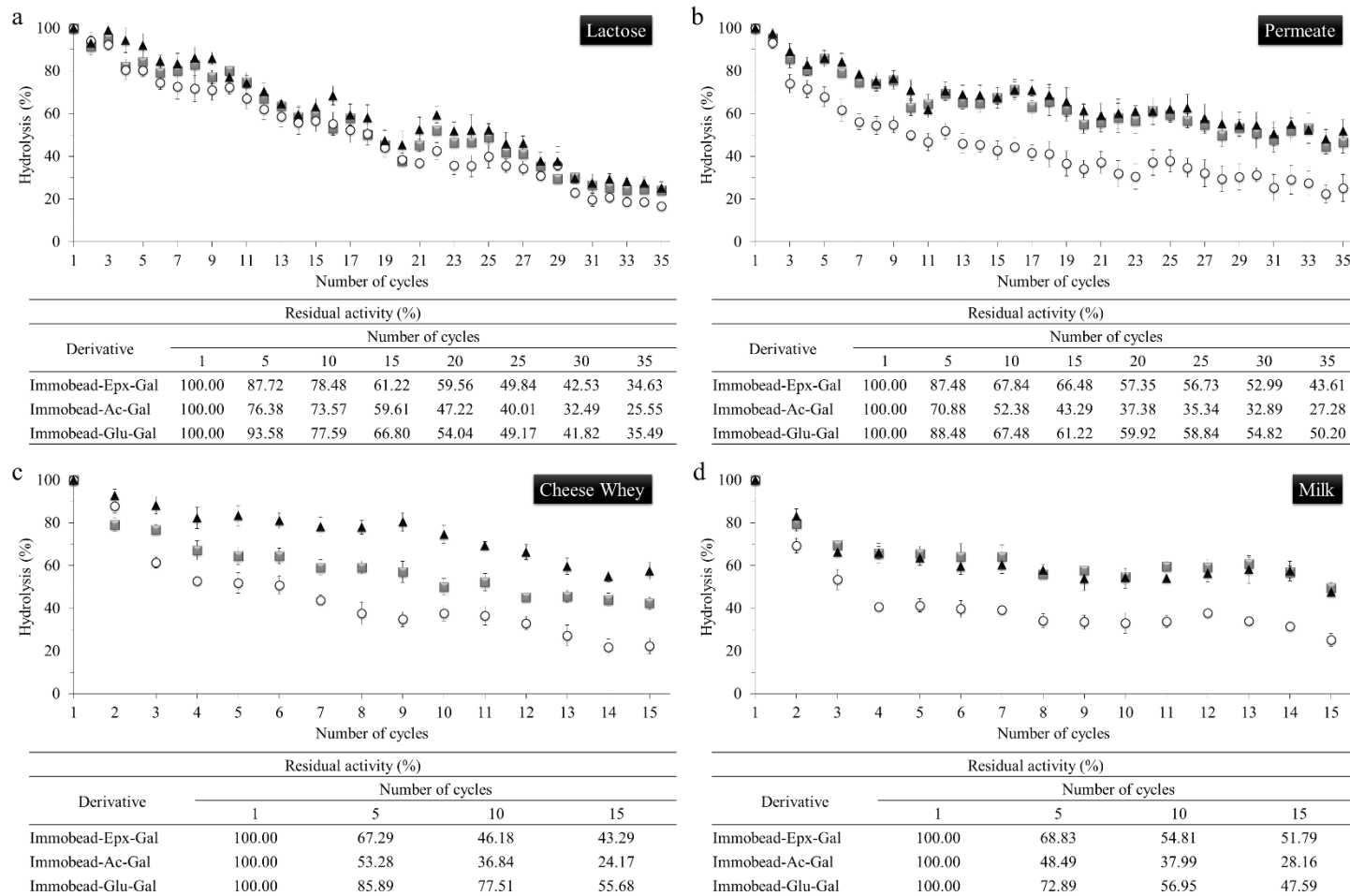


Figure 3. Reusability of immobilized β -galactosidase: (■) Immobead-Epx-Gal; (○) Immobead-Ac-Gal; (▲) Immobead-Glu-Gal. The hydrolysis of the lactose using immobilized β -galactosidase was conducted in (a) lactose solution, (b) whey permeate, (c) cheese whey, and (d) skim milk, and all were reconstituted to 5 % w/v of lactose. The residual activity and the degree of hydrolysis of each derivative after the first cycle were defined as 100 % of the activity and hydrolysis, respectively, and were monitored during the reuse cycles.

Conclusion

In this work, we studied the modification of epoxy groups on Immobead 150 supports and the immobilization of β -galactosidase on unmodified and modified supports. The immobilization yields and efficiencies were generally high for both unmodified and modified Immobead 150. The immobilized enzymes showed an optimal pH value at 6.0, while the maximal activity levels were found at 55 °C for the free enzymes and 60 °C for the immobilized forms. The immobilization changed the kinetic parameters independently of the protocol. The three derivatives presented half-life values higher than the soluble form in all of the temperatures tested. The immobilized β -galactosidase could be reused when tested in repeated batches using a lactose solution, whey permeate, cheese whey, and skim milk and retained approximately 50 % of the initial activity after 20 cycles of hydrolysis of the lactose solution. The nature of the enzyme-support interaction was shown as a key factor for the stability of the immobilized enzyme, where the modification with glutaraldehyde improved thermal and operational stabilities. These results suggest that Immobead 150 is a promising support for the immobilization of β -galactosidase.

Acknowledgements

We would like to acknowledge CNPq, CAPES, and FAPERGS for the scholarships and UNIVATES for the financial support granted for this research paper. We would also like to thank the Prozyn Company for the enzyme donation.

Conflict of interests

The authors declare they don't have any conflict of interest.

References

1. Barbosa O, Torres R, Ortiz C, Berenguer-Murcia A, Rodrigues RC, Fernandez-Lafuente R. Heterofunctional supports in enzyme immobilization: from traditional immobilization protocols to opportunities in tuning enzyme properties. *Biomacromolecules*. 2013;14:2433-2462.
2. Kotwal SM, Shankar V. Immobilized invertase. *Biotechnol Adv*. 2009;27:311-322.
3. Bolivar JM, Eisl I, Nidetzky B. Advanced characterization of immobilized enzymes as heterogeneous biocatalysts. *Catal Today*. 2016;259:66-80.

4. Rodrigues RC, Ortiz C, Berenguer-Murcia Á, Torres R, Fernández-Lafuente R. Modifying enzyme activity and selectivity by immobilization. *Chem Soc Rev.* 2013;42:6290-6307.
5. Panesar PS, Kumari S, Panesar R. Potential applications of immobilized β -galactosidase in food processing industries. *Enzyme Res.* 2010.
6. Sheldon RA, van Pelt S. Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. *Chem Soc Rev.* 2013;42:6223-6235.
7. Dalla-Vecchia R, da Graça Nascimento M, Soldi V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. *Quim Nova.* 2004;27:623-630.
8. Turkova J, Blaha K, Malanikova M, Vančurová D, Švec F, Kalal J. Methacrylate gels with epoxide groups as supports for immobilization of enzymes in pH range 3–12. *Biochim Biophys Acta.* 1978;524:162-169.
9. Mateo C, Abian O, Fernández-Lorente G, Pedroche J, Fernández-Lafuente R, Guisan JM. Epoxy sepabeads: a novel epoxy support for stabilization of industrial enzymes via very intense multipoint covalent attachment. *Biotechnol Prog.* 2002;18:629-634.
10. Mateo C, Abian O, Fernandez–Lafuente R, Guisan JM. Increase in conformational stability of enzymes immobilized on epoxy-activated supports by favoring additional multipoint covalent attachment. *Enzyme Microb Technol.* 2000;26:509-515.
11. Katchalski-Katzir E, Kraemer DM. Eupergit® C, a carrier for immobilization of enzymes of industrial potential. *J Mol Catal B Enzym.* 2000;10:157-176.
12. Torres-Salas P, del Monte-Martinez A, Cutiño-Avila B, Rodriguez-Colinas B, Alcalde M, Ballesteros AO, Plou FJ. Immobilized biocatalysts: Novel approaches and tools for binding enzymes to supports. *Adv Mater.* 2011;23:5275-5282.
13. Mateo C, Palomo JM, Fernandez-Lorente G, Guisan JM, Fernandez-Lafuente R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme Microb Technol.* 2007;40:1451-1463.
14. Alagöz D, Çelik A, Yildirim D, Tükel SS, Binay B. Covalent immobilization of *Candida methylica* formate dehydrogenase on short spacer arm aldehyde group containing supports. *J Mol Catal B Enzym.* 2016;130:40-47.
15. Kang I, Bang HJ, Kim IH, Choi HD, Kim BH. Synthesis of trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid-enriched triacylglycerols via two-step lipase-catalyzed esterification. *Food Sci Technol.* 2015;62:249-256.
16. Madalozzo AD, Martini VP, Kuniyoshi KK, de Souza EM, Pedrosa FO, Glogauer A, Zanin GM, Mitchell DA, Krieger N. Immobilization of LipC12, a new lipase obtained by

metagenomics, and its application in the synthesis of biodiesel esters. *J Mol Catal B Enzym.* 2015;116:45-51.

17. Matte CR, Bordinhão C, Poppe JK, Rodrigues RC, Hertz PF, Ayub MA. Synthesis of butyl butyrate in batch and continuous enzymatic reactors using *Thermomyces lanuginosus* lipase immobilized in Immobead 150. *J Mol Catal B Enzym.* 2016;127:67-75.

18. Kahar UM, Sani MH, Chan KG, Goh KM. Immobilization of α -amylase from *Anoxybacillus* sp. SK3-4 on ReliZyme and Immobead supports. *Molecules.* 2016;21:1196.

19. González-Cataño F, Tovar-Castro L, Castaño-Tostado E, Regalado-Gonzalez C, García-Almendarez B, Cardador-Martínez A, Amaya-Llano S. Improvement of covalent immobilization procedure of β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* for galactooligosaccharides production: Modelling and kinetic study. *Biotechnol Prog.* 2017.

20. Dutra Rosolen M, Gennari A, Volpato G, de Souza CFV. Biocatalytic characterization of *Aspergillus oryzae* β -galactosidase immobilized on functionalized multi-walled carbon nanotubes. *Biocatal Biotransformation.* 2017:1-9.

21. Ali G, Dulong V, Gasmi SN, Rihouey C, Picton L, Le Cerf D. Covalent immobilization of pullulanase on alginate and study of its hydrolysis of pullulan. *Biotechnol Prog.* 2015;31:883-889.

22. Fernandez-Lafuente R, Rosell CM, Rodríguez V, Santana C, Soler G, Bastida A, Guisan JM. Preparation of activated supports containing low pK amino groups. A new tool for protein immobilization via the carboxyl coupling method. *Enzyme Microb Technol.* 1993;15:546-550.

23. Barbosa, O, Ortiz C, Berenguer-Murcia Á, Torres R, Rodrigues RC, Fernandez-Lafuente R. Glutaraldehyde in bio-catalysts design: a useful crosslinker and a versatile tool in enzyme immobilization. *RSC Adv.* 2014;4:1583-1600.

24. Rodrigues RC, Barbosa O, Ortiz C, Berenguer-Murcia Á, Torres R, Fernandez-Lafuente R. Amination of enzymes to improve biocatalyst performance: coupling genetic modification and physicochemical tools. *RSC Adv.* 2014;4:38350-38374.

25. Nussinovitch A, Chapnik N, Gal J, Froy O. Delivery of lactase using chocolate-coated agarose carriers. *Food Res Int.* 2012;46:41-45.

26. Grosova Z, Rosenberg M, Rebros M. Perspectives and applications of immobilised β -galactosidase in food industry: A review. *Czech J Food Sci.* 2008;26:1-14.

27. Husain Q. β -Galactosidases and their potential applications: a review. *Crit Rev Biotechnol.* 2010;30:41-62.

28. Guerrero C, Vera C, Serna N, Illanes A. Immobilization of *Aspergillus oryzae* β -galactosidase in an agarose matrix functionalized by four different methods and application to the synthesis of lactulose. *Bioresour Technol.* 2017;232:53-63.
29. Osman A, Symeou S, Trisse V, Watson KA, Tzortzis G, Charalampopoulos D. Synthesis of prebiotic galactooligosaccharides from lactose using bifidobacterial β -galactosidase (BbgIV) immobilised on DEAE-Cellulose, Q-Sepharose and amino-ethyl agarose. *Biochem Eng J.* 2014;82:188-199.
30. Facin BR, Moret B, Baretta D, Belfiore LA, Paulino AT. Immobilization and controlled release of β -galactosidase from chitosan-grafted hydrogels. *Food Chem.* 2015;179:44-51.
31. Klein MP, Hackenhaar CR, Lorenzoni AS, Rodrigues RC, Costa TM, Ninow JL, Hertz PF. Chitosan crosslinked with genipin as support matrix for application in food process: Support characterization and β -d-galactosidase immobilization. *Carbohydr Polym.* 2016;137:184-190.
32. Ansari SA, Satar R, Kashif Zaidi S, Ahmad A. Immobilization of *Aspergillus oryzae* β -Galactosidase on cellulose acetate-polymethylmethacrylate membrane and its application in hydrolysis of lactose from milk and whey. *Int Sch Res Notices.* 2014.
33. Güleç, HA. Immobilization of β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* onto polymeric membrane surfaces: Effect of surface characteristics. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2013;104:83-90.
34. Vasileva N, Iotov V, Ivanov Y, Godjevargova T, Kotia N. Immobilization of β -galactosidase on modified polypropylene membranes. *Int J Biol Macromol.* 2012;51:710-719.
35. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248-254.
36. Mariotti MP, Yamanaka H, Araujo AR, Trevisan HC. Hydrolysis of whey lactose by immobilized β -galactosidase. *Braz Arch Biol Technol.* 2008;51:1233-1240.
37. Mubarak NM, Wong JR, Tan KW, Sahu JN, Abdullah EC, Jayakumar NS, Ganesan P. Immobilization of cellulase enzyme on functionalized multiwall carbon nanotubes. *J Mol Catal B Enzym.* 2014;107:124-131.
38. Sundberg L, Porath J. Preparation of adsorbents for biospecific affinity chromatography. Attachment of group-containing ligands to insoluble polymers by means of bifunctional oxiranes. *J Chromatogr.* 1974;90:87-98.
39. Kikani BA, Singh SP. Enzyme stability, thermodynamics and secondary structures of α -amylase as probed by the CD spectroscopy. *Int J Biol Macromol.* 2015;81:450-460.

40. Wang F, Guo C, Liu HZ, Liu CZ. Immobilization of *Pycnoporus sanguineus* laccase by metal affinity adsorption on magnetic chelator particles. *J Chem Technol Biotechnol*. 2008;83:97-104.
41. Wine Y, Cohen-Hadar N, Freeman A, Frolov F. Elucidation of the mechanism and end products of glutaraldehyde crosslinking reaction by X-ray structure analysis. *Biotechnol Bioeng*. 2007;98:711-718.
42. Migneault I, Dartiguenave C, Bertrand MJ, Waldron KC. Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking. *Biotechniques*. 2004;37: 790-806.
43. Balasubramanian K, Burghard M. Chemically functionalized carbon nanotubes. *Small*. 2005;1:180-192.
44. Liu H, Liu J, Tan B, Zhou F, Qin Y, Yang R. Covalent immobilization of *Kluyveromyces fragilis* β -galactosidase on magnetic nanosized epoxy support for synthesis of galacto-oligosaccharide. *Bioprocess Biosyst Eng*. 2012;35:1287-1295.
45. Zhang S, Gao S, Gao G. Immobilization of β -galactosidase onto magnetic beads. *Appl Biochem Biotechnol*. 2010;160:1386-1393.
46. Türlüç O, Kahraman MV, Akdemir ZS, Kayaman-Apohan N, Güngör A. Immobilization of α -amylase onto cyclic carbonate bearing hybrid material. *Food Chem*. 2009;112:992-997.
47. Alptekin Ö, Tükel SS, Yıldırım D, Alagöz D. Immobilization of catalase onto Eupergit C and its characterization. *J Mol Catal B Enzym*. 2010;64:177-183.
48. Zhou QZ, Chen XD. Immobilization of β -galactosidase on graphite surface by glutaraldehyde. *J Food Eng*. 2001;48:69-74.
49. Jiang H, Zou H, Wang H, Ni J, Zhang Q, Zhang Y. On-line characterization of the activity and reaction kinetics of immobilized enzyme by high-performance frontal analysis. *J Chromatogr A*. 2000;903:77-84.
50. Pessela BCC, Mateo C, Fuentes M, Vian A, García JL, Carrascosa AV, Guisán JM, Fernández-Lafuente R. The immobilization of a thermophilic β -galactosidase on Sepabeads supports decreases product inhibition: Complete hydrolysis of lactose in dairy products. *Enzyme Microb Technol*. 2003;33:199-205.
51. Torres P, Batista-Viera F. Improved biocatalysts based on *Bacillus circulans* β -galactosidase immobilized onto epoxy-activated acrylic supports: Applications in whey processing. *J Mol Catal B Enzym*. 2012;83:57-64.

52. Ansari SA, Husain Q. Lactose hydrolysis from milk/whey in batch and continuous processes by concanavalin A-Celite 545 immobilized *Aspergillus oryzae* β galactosidase. *Food Bioprod Process*. 2012;90:351-359.
53. Matsuno H, Nagasaka Y, Kurita K, Serizawa T. Superior activities of enzymes physically immobilized on structurally regular poly (methyl methacrylate) surfaces. *Chem Mater*. 2007;19:2174-2179.
54. Valerio SG, Alves JS, Klein MP, Rodrigues RC, Hertz PF. High operational stability of invertase from *Saccharomyces cerevisiae* immobilized on chitosan nanoparticles. *Carbohydr Polym*. 2013;92:462-468.
55. Asuri P, Karajanagi SS, Sellitto E, Kim DY, Kane RS, Dordick JS. Water-soluble carbon nanotube-enzyme conjugates as functional biocatalytic formulations. *Biotechnol Bioeng*. 2006;95:804-811.
56. Cao L, Schmid R. D. Carrier-Bound Immobilized Enzymes. 2005.
57. Aguiar-Oliveira E, Maugeri F. Thermal stability of the immobilized fructosyltransferase from *Rhodotorula* sp. *Braz J Chem Eng*. 2011;28:363-372.
58. da Silva Campello G, Trindade RA, Rêgo TV, de Medeiros Burkert JF, Burkert CAV. Immobilization of β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* on Eupergit® C and properties of the biocatalyst. *Int J Food Eng*. 2012;8:24.
59. Gummadi SN. What is the role of thermodynamics on protein stability?. *Biotechnol Bioprocess Eng*. 2003;8:9-18.
60. Azevedo RM, Costa JB, Serp P, Loureiro JM, Faria JL, Silva CG, Tavares AP. A strategy for improving peroxidase stability via immobilization on surface modified multi-walled carbon nanotubes. *J Chem Technol Biotechnol*. 2015;90:1570-1578.
61. Chen CS, Hsu CK, Chiang BH. Optimization of the enzymic process for manufacturing low-lactose milk containing oligosaccharides. *Process Biochem*. 2002;38:801-808.
62. Kosseva MR, Panesar PS, Kaur G, Kennedy JF. Use of immobilised biocatalysts in the processing of cheese whey. *Int J Biol Macromol*. 2009;45:437-447.
63. Wahba MI. Chitosan-glutaraldehyde activated calcium pectinate beads as a covalent immobilization support. *Biocatal Agric Biotechnol*. 2017;12:266-274.

4.2 Chelation by collagen in the immobilization of *Aspergillus oryzae* β -galactosidase: a potential biocatalyst to hydrolyze lactose by batch processes. Artigo publicado no periódico *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 109, p. 303-310, 2018.



Chelation by collagen in the immobilization of *Aspergillus oryzae* β -galactosidase: A potential biocatalyst to hydrolyze lactose by batch processes

Adriano Gennari^a, Francielle Herrmann Mobayed^a, Giandra Volpato^b,
Claucia Fernanda Volken de Souza^{a,*}

^a Laboratório de Biotecnologia de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade do Vale do Taquari – Univates, Lajeado, RS, Brazil

^b Curso de Biotecnologia, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul – IFRS, Campus Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 October 2017

Received in revised form 7 December 2017

Accepted 16 December 2017

Available online 16 December 2017

Keywords:

Aluminum

Low-cost support

Protein load

ABSTRACT

This work is the first study of the immobilization of *Aspergillus oryzae* β -galactosidase (Gal) on powdered collagen (Col) that had formed a chelate with aluminum (Col-Al-Gal). Other collagen treatments, including those with acetic acid, glutaraldehyde, and a combination of aluminum and glutaraldehyde (Col-Al-Glu-Gal), were also tested. High-yield (superior to 80%) and high-efficiency (superior to 99%) immobilization was obtained for the derivatives Col-Al-Gal and Col-Al-Glu-Gal, even at high protein loads (500–1,000 mg g⁻¹ of support). The storage stability of Gal immobilized on Col-Al and Col-Al-Glu resulted in Gal retaining approximately 60% of its initial activity after 90 days at 4 °C. The half-life values of derivatives Col-Al-Gal and Col-Al-Glu-Gal were higher than those of soluble enzyme at 65, 68, 70, and 73 °C. The derivatives Col-Al-Gal and Col-Al-Glu-Gal retained high enzyme activity in batch hydrolysis of lactose in permeate and lactose solutions for 50 and 60 cycles, respectively. Our results suggest that powdered collagen treated with aluminum, a low-cost support, is a promising support for the immobilization of β -galactosidase.

© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

β -Galactosidase, most commonly known as lactase, is classified as a hydrolase and can transfer galactosyl groups, catalyzing the hydrolysis of the terminal residue from lactose to form a 1:1 mixture of glucose and galactose [1,2]. Lactase from *Aspergillus oryzae* is a monomeric enzyme having a molecular weight of 90 kDa, an optimal pH range from 4.0 to 5.0 and an optimal temperature of 55 °C. It is used to prepare lactose-free milk and other dairy products at the industrial level for lactose-intolerant individuals. It is also applied to reduce the problems of lactose insolubility and the lack of sweetness of dairy products [3,4].

The use of soluble enzymes in industrial processes has limitations such as their low stability, non-reusability and high cost. It would be advantageous to employ an immobilized enzyme since it allows product separation and the reuse of the biocatalyst [5,6]. An

important stage in the enzyme immobilization process is the choice of the support, which requires the consideration of factors such as productivity, efficiency, availability and cost [7]. β -Galactosidase has been immobilized on different supports composed of inorganic and organic materials. However, the use of alternative supports that are of low cost, easily obtainable, and biodegradable could reduce the cost of enzyme immobilization and facilitate its implementation on the industrial scale [8].

Collagen is an insoluble organic protein found in skin, tendons, ligaments and bones. It is composed of three polypeptide chains with triple helical structures that aggregate through hydrogen bonds. This protein is obtainable as a fiber, as a powder and in the hydrolyzed form. The collagen structure has abundant functional groups such as –OH, –COOH, –CONH₂ and –NH₂ and is thus ready to react with other chemicals [9,10]. Interest in the extraction of collagen and its derivatives has increased due to the trend of using this protein to replace synthetic agents in the diverse industrial processes [11].

Diverse forms of collagen have been employed as supports for enzyme immobilization, e.g., fibers have been used for lysozyme [12], catalase [13,14], and β -galactosidase [15]; powders for naringinase [16]; and membranes for β -galactosidase [17,18], and

* Corresponding Author. Laboratório de Biotecnologia de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade do Vale do Taquari – Univates, Av. Avelino Tallini, 171, ZC 95914–014, Lajeado, RS, Brazil.

E-mail address: claucia@univates.br (C.F.V. de Souza).

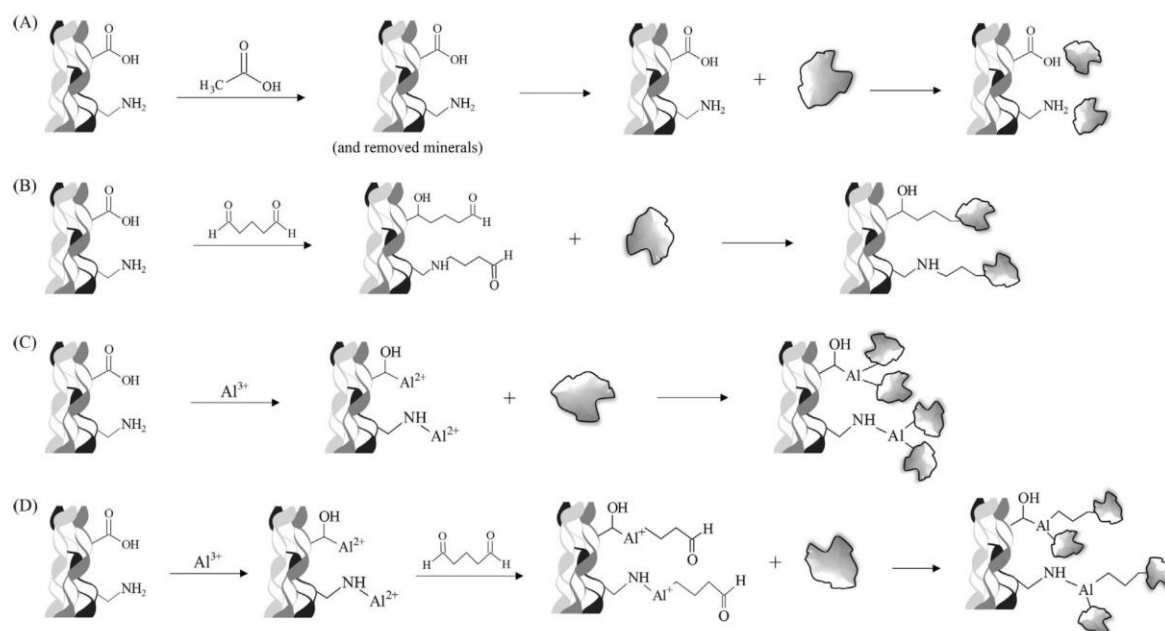


Fig 1. Scheme of collagen preparations with: (A) acetic acid, (B) glutaraldehyde, (C) aluminum and (D) aluminum + glutaraldehyde.

α -amylase [19]. The advantages of greater surface area and versatility for use in bioreactors are demonstrated when powdered collagen, compared to other forms, is used as a support for enzyme immobilization. Nevertheless, studies that use powdered collagen for β -galactosidase immobilization are lacking.

The *Aspergillus oryzae* β -galactosidase was immobilized in this work using powdered collagen as matrix. The support was treated by four different protocols, involving acetic acid, glutaraldehyde, aluminum sulfate or a combination of aluminum sulfate and glutaraldehyde (Fig. 1). The treated supports were tested by varying the protein loading. The collagen was characterized by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and thermogravimetric analysis. The immobilized derivatives were evaluated for their operational conditions, thermal and storage stabilities, kinetic parameters and reusability in batch processes.

2. Materials and methods

2.1. Materials

β -Galactosidase from *Aspergillus oryzae* (Gal) was donated by the Prozyn Company (São Paulo, Brazil). Powdered skim milk and powdered cheese whey were purchased from Brazil Foods S.A. (Rio Grande do Sul, Brazil). Powdered whey permeate was provided by Arla Foods (Córdoba, Argentina). The enzymatic kit for glucose determination was acquired from Labtest (Minas Gerais, Brazil). Powdered collagen (type-I from bovine skin) was donated by the Luchebras Company (Cachoeirinha, Brazil). Ortho-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside (ONPG) and other chemicals were purchased from the Sigma Aldrich Co. (St. Louis, USA). All of the other reagents were of analytical grade.

2.2. Collagen preparations

The collagen (Col) was treated with four different methods. In the first method, the support was treated with an acetic acid solution (Col-HAc) following the method proposed by Liao et al. [9]. For

this process, 1.0 g of the support was suspended with 30 mL of an acetic acid solution (25%, v/v) and stirred at 150 rpm for 12 h.

Collagen was also treated with glutaraldehyde (Col-Glu) according to a method described by Mariotti et al. [20]. Briefly, 1.0 g of collagen was mixed with 30 mL of a glutaraldehyde solution (5%, v/v) and stirred at 150 rpm for 12 h.

In another method, collagen was treated with aluminum sulfate (Col-Al) by the modified method of Song et al. [14]. For this process, 1.0 g collagen was suspended in 60 mL of deionized water whose pH was then adjusted to 3.5 using acetic acid and stirred at 150 rpm for 18 h at 25 °C. Subsequently, 2.4 g of $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ was added and stirring continued at 150 rpm for 4 h at 30 °C. The pH value of the suspension was then increased dropwise to 7.0 using a NaHCO_3 solution (15%, w/v), and the reaction was stirred at 40 °C for 4 h at 150 rpm.

The support was also submitted to a combination of treatments using aluminum sulfate and glutaraldehyde (Col-Al-Glu). In this process, when the treatment with aluminum (as above) was completed, the collagen was resuspended in 30 mL of a glutaraldehyde solution (5%, v/v) and stirred at 150 rpm for 12 h.

The treated supports were recovered by centrifugation (1,000g, 25 °C, 1 min), washed with ultra-pure water to remove traces of reagents and stored in sodium acetate buffer (100 mM, pH 4.5) until further use.

2.3. β -Galactosidase immobilization

β -Galactosidase was immobilized on treated supports (Col-HAc, Col-Glu, Col-Al, and Col-Al-Glu). The immobilizations were conducted by adding 60 mL of β -galactosidase solution (10–1200 mg of protein per gram of support) prepared in a sodium acetate buffer (100 mM, pH 4.5) to 1 g of each support. The mixtures were stirred at 150 rpm for 48 h. During this process, supernatant and suspension samples were periodically collected so that the enzyme activity and protein content could be monitored. Immobilized β -galactosidase was separated by centrifugation (1,000g, 25 °C, 1 min). The derivatives (Col-HAc-Gal, Col-Glu-Gal, Col-Al-Gal, and Col-Al-Glu-Gal) were then washed twice with sodium acetate

buffer (100 mM, pH 4.5). The immobilization yield and immobilization efficiency were calculated according to the method of Sheldon and Van Pelt [21].

2.4. β -Galactosidase activity assay and protein quantification

The activity of the free and immobilized β -galactosidases was determined spectrophotometrically using ONPG as a substrate. The reaction was conducted by mixing 50 μ L of the enzyme solution or derivative suspension with 450 μ L of the substrate solution (18 mM ONPG in 100 mM sodium acetate buffer, pH 4.5) for 2 min at 55 °C in a water bath while stirring at 120 rpm. The reaction was stopped by the addition of 1.5 mL of a sodium carbonate solution (2 M, pH 9.8). The absorbance was measured at 415 nm. One β -galactosidase unit was defined as the amount of enzyme that releases 1 μ mol of *ortho*-nitrophenol ($\epsilon_{415} = 4500 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) per minute under the defined assay conditions. The protein concentration of the enzyme solutions was determined using the Bradford method with Bio-Rad[®] protein dye (St. Louis, MO, USA) reagent concentrate and bovine serum albumin as the standard protein [22].

2.5. Derivatives characterization

The collagen, Col-Al, and Col-Al-Glu supports and the derivatives Col-Al-Gal and Col-Al-Glu-Gal were examined by FTIR with a Shimadzu IRAffinity-1 spectrometer. Infrared spectra were obtained using KBr pellets at room temperature with 45 accumulated scans and 4 cm^{-1} resolution. Thermogravimetric analysis (TGA) of type-I collagen employed as a support was performed using a Perkin-Elmer TGA 4000 instrument with a heating rate of 5 °C min^{-1} in a temperature range from 25 to 550 °C under nitrogen atmosphere.

The optimal pH values for free and immobilized β -galactosidase activity was determined by measuring the activity at 55 °C at pH values ranging from 4.0 to 8.0. The buffers were sodium acetate (100 mM, pH 4.0–6.0) and potassium phosphate (100 mM, pH 6.5–8.0). To study the effect of the temperature, we varied it from 4.0 to 75 °C while fixing the pH at 4.5. The specific activity of free or immobilized β -galactosidases at an optimal pH or temperature value was considered 100% activity, and the relative activity at each tested pH and temperature, separately, was calculated as a percentage of the 100% activity.

In addition, free and immobilized β -galactosidases were stored in sodium acetate buffer (100 mM, pH 4.5) at 4 °C for 3 months, and their residual activity over time was measured to evaluate their storage stability. The activity determined on the first day was taken as the control (100%) for the calculation of the residual activity.

Kinetic parameters of free and immobilized β -galactosidases were determined by changing the ONPG concentration (3–18 mM) and stirring at 120 rpm. The K_M (Michaelis constant) and V_{max} (maximum rate of the reaction) values were determined using the Michaelis-Menten model and a Lineweaver-Burk linearization according to Eq. (1):

$$\frac{1}{V} = \frac{K_M}{V_{max}} \times \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \quad (1)$$

where V (mM min^{-1}) is the catalytic reaction rate, V_{max} (mM min^{-1}) is the maximum velocity, $[S]$ is the substrate concentration (mM), and K_M is the Michaelis constant (mM).

The turnover number (k_{cat}) (min^{-1}) of free and immobilized β -galactosidases was calculated according to Eq. (2):

$$k_{cat} = \frac{V_{max}}{[E_T]} \quad (2)$$

where V_{max} (mM min^{-1}) is the maximum velocity and $[E_T]$ is the total concentration (mM) of enzyme in the reaction medium.

The catalytic specificity constant ($\text{mM}^{-1} \text{min}^{-1}$) of free and immobilized β -galactosidases was calculated as the turnover number (k_{cat}) (min^{-1}) divided by the Michaelis constant (K_M) (mM).

The thermal stability of the free and immobilized β -galactosidases was determined by incubating the samples at 65, 68, 70 and 73 °C and measuring the residual β -galactosidase activity over time. These temperatures were established from our previous results and literature [4,5,14]. The thermodynamic parameters were calculated according to a simplified deactivation model described in the literature [23].

The energy of activation (E_a) for the inactivation process was calculated by using nonlinear regression and considering the Arrhenius plot (Eq. (3)):

$$k = A \cdot e^{-\frac{E_a}{RT}} \quad (3)$$

where k (min^{-1}) is the kinetic deactivation constant, A (min^{-1}) is the preexponential factor, E_a (J mol^{-1}) is the energy of activation, R ($8.314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$) is the universal gas constant, and T (K) is the temperature.

The half-life ($t_{1/2}$) of the enzyme is defined as the time required for the enzyme to lose half of its initial activity. The half-life was estimated using Eq. (4):

$$t_{1/2} = \ln 2 / k \quad (4)$$

where $t_{1/2}$ (min) is the half-life and k (min^{-1}) is the kinetic deactivation constant.

The stabilization factor (SF) at a specific temperature was calculated by dividing the half-life of each immobilized β -galactosidase by the half-life of free β -galactosidase (Free-Gal).

Gibb's free energies of thermal inactivation (ΔG) were calculated using the first-order rate constant of the inactivation process at different temperatures and Eq. (5):

$$\Delta G = -R \cdot T \cdot \ln \left(\frac{k \cdot h}{k_B \cdot T} \right) \quad (5)$$

where R ($8.314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$) is the universal gas constant, T (K) is the temperature, k (min^{-1}) is the kinetic deactivation constant, h ($6.6262 \times 10^{-34} \text{ J s}$) is the Planck constant, and k_B ($1.3806 \times 10^{-23} \text{ J K}^{-1}$) is the Boltzmann constant.

The enthalpy change (ΔH) was calculated from the energy of activation ($\Delta H = E_a - RT$), and the entropy change (ΔS) from the changes in enthalpy and Gibb's free energy ($T\Delta S = \Delta H - \Delta G$).

2.6. Reusability of the immobilized β -galactosidase in batch processes

The reusability of the immobilized β -galactosidase was determined by monitoring the hydrolysis of 10 mL of lactose, whey permeate, cheese whey, and skim milk solutions (all reconstituted to 5% w/v of lactose) by 100 mg of the immobilized preparation at 4 °C and 150 rpm for 30 min. At the end of each cycle, the immobilized enzyme was collected by centrifugation (1,000g, 1 min, 25 °C), washed with sodium acetate buffer (100 mM, pH 4.5) and placed on fresh substrate for the next cycle. In addition, we collected the immobilized enzyme after each reaction to determine the residual activity using ONPG as the substrate according to Section 2.4. The residual activity of each derivative after the first cycle was considered 100% activity. The supernatant of the solution was also collected after each reaction to determine the percentage of lactose hydrolysis by measuring the formation of glucose with a glucose oxidase kit. The degree of hydrolysis of each derivative after the first cycle was defined as 100% hydrolysis.

2.7. Statistical analysis

All experiments and analyses were performed in triplicate. The statistical evaluation of immobilization yield and immobilization efficiency was performed through one-way analyses of variance (ANOVA), and the significance of the model was verified by the F test. In the significance models, the averages were compared with a Tukey test at a significance level of 95% ($p < .05$) using the BioEstat 5.0 software.

3. Results and discussion

Collagens receiving one of four treatments, acetic acid (Col-HAc), glutaraldehyde (Col-Glu), aluminum sulfate (Col-Al), and a combination with aluminum sulfate and glutaraldehyde (Col-Al-Glu), were tested for their ability to immobilize *Aspergillus oryzae* β -galactosidase (Fig. 1). Table 1 shows the influence of the treatments in the yields and efficiencies of the β -galactosidase immobilized on the collagens.

Table 1 shows that the immobilization yields of Col-Al-Gal and Col-Al-Glu-Gal were greater than 90% in loads from 10 to 300 mg g⁻¹ of support. The yields of Col-Glu-Gal and Col-HAc-Gal, compared with those of collagen receiving aluminum treatments, were significantly lower ($p < 0.05$) with identical protein loads.

In the Col-Al preparation, the support was first reacted with Al(III) to enhance its stability. In this reaction, the pH of the solution was responsible for the permeation of Al(III) and its reaction with collagen. The initial pH of the reaction was thus maintained at approximately 3.5 to favor the permeation of aluminum; the pH was then increased to 7.0 to promote the reaction of the metal with the support. The aluminum is probably chelated by $-\text{COOH}$ and $-\text{NH}_2$ groups in the side chains of the enzyme and collagen [14]. The combination of treatments in Col-Al-Glu might also bind Al(III) with glutaraldehyde. In this case, the immobilization may occur via both chelate formation with aluminum and by intermolecular crosslinking with glutaraldehyde. The lysine residues of β -galactosidase were also crosslinked with aldehyde groups of glutaraldehyde in Col-Glu [24]. Acetic acid treatment to form Col-HAc was previously reported by Liao et al. to remove mineral substances of collagen, allowing more stable adsorption in the collagen-enzyme interactions [9].

Considering the enzyme concentrations and the immobilization yields and efficiency (Table 1), we selected Col-Al and Col-Al-Glu treatments to study the process at higher protein loads. Table 2 shows the immobilization parameters of β -galactosidase immobilized on collagen using loads from 500 to 1200 mg of protein per gram of support.

When loads less than 1000 mg g⁻¹ of support were used, the yields of Col-Al-Gal and Col-Al-Glu-Gal did not significantly differ ($p < 0.05$) between protein loads. The efficiency values were higher than 100% in most cases, showing a high retention of activity after the immobilization of the enzyme. Efficiency values more than 100% are not uncommon and were probably caused by the opening of the active site of the enzyme after immobilization [25]. Working with a similar support, Song et al. [14] studied the immobilization of catalase on collagen fibers modified with zirconium. The support was, as in this work, modified with a chelated metal. The authors obtained lower values than our study, approximately 60 and 41% yield and efficiency of immobilization, respectively. This difference was attributed to the amount of metal used for collagen modification: they added 3.5 mmol of Zr(IV)/g of collagen, while we used approximately 14.0 mmol of Al(III)/g.

The high loads achieved in Col-Al-Gal and Col-Al-Glu-Gal materials were likely caused by chelate formation (covalent immobilization) between the collagen and β -galactosidase with

aluminum. As reported by Evans et al. [26] and Song et al. [14], collagen is capable of chemically reacting with many kinds of metal ions, and the amount of aluminum that is added allows a multi-point interaction between collagen, aluminum and enzyme. The glutaraldehyde-mediated crosslinking in Col-Al-Glu-Gal did not improve the immobilized load but probably stabilized intermolecular enzyme interactions [27].

Considering the enzyme concentrations and the immobilization yields and efficiencies, we chose to evaluate the derivatives Col-Al-Gal and Col-Al-Glu-Gal with protein loads of 1,000 mg g⁻¹ of support.

The structure of the collagen, Col-Al, and Col-Al-Glu supports and the derivatives Col-Al-Gal and Col-Al-Glu-Gal were analyzed by FTIR, and the thermal decomposition of collagen was evaluated by TGA to examine possible interactions between β -galactosidase and the supports. Figs. 2A and 2B illustrate the FTIR spectra of the supports (collagen, Col-Al, and Col-Al-Glu) and the derivatives (Col-Al-Gal and Col-Al-Glu-Gal), respectively. Fig. 2C shows the TGA curve of collagen.

Fig. 2A (I) shows that the spectrum of collagen displayed characteristic adsorption bands at 1643, 1523 and 1237 cm⁻¹, which represent the amide I, II and III bands, respectively [28]. The amide I absorption (~ 1640 cm⁻¹) arises predominantly from C=O stretching vibrations, and the amide II band (~ 1520 cm⁻¹) is composed of amide N–H bending and C–N stretching vibrations [29]. The amide III absorption (~ 1240 cm⁻¹) consists of components from C–N stretching and N–H in-plane bending of amide linkages. Furthermore, the stretching of $-\text{OH}$, $-\text{CH}_2$ and pyrrolidine rings are represented by ~ 3300 , ~ 2930 and ~ 1444 cm⁻¹ bands, respectively [30,31]. These results indicate that $-\text{NH}_2$ and $-\text{COOH}$, which are the side chain groups of collagen, interact with other compounds [32]. The modification of collagen with aluminum (Fig. 2A II) and with aluminum + glutaraldehyde (Fig. 2A III) preserved the amide I and II bands of collagen, which indicates that the secondary structure of collagen does not change after reacting with Al(III) ions. The amide III peak of collagen at approximately 1234 cm⁻¹ almost disappears, which might be attributed to the reaction between Al(III) ions and the amino groups of collagen. Furthermore, a strong absorption peak appears at 1140 cm⁻¹, which might be attributed to the ring structure formed after aluminum reacted with collagen [13,14]. These results indicated that Al(III) successfully bound collagen. Fig. 2B (IV) and B (V) demonstrate that the immobilization of β -galactosidase in Col-Al-Gal and Col-Al-Glu-Gal, respectively, does not change its spectral profile.

The TGA curve of collagen (Fig. 2C) shows that weight loss occurred in two stages: the first stage, at approximately 80 °C, was attributed to the loss of water bonded to the collagen structure, while the second, at approximately 250 °C, was related to the thermal degradation of the polymeric chains [28,31]. The carbonization of the polymeric material was verified at temperatures higher than 400 °C [33].

Fig. 3 shows the effects of pH and temperature on the activity of free and immobilized β -galactosidases. As seen in Fig. 3A, the optimal pH value for Free-Gal was 5.0, while the value for both immobilized biocatalysts was 6.0, indicating that the conformation was altered by the immobilization of monomeric β -galactosidase [34]. The optimum temperature (Fig. 3B) of enzyme activity remained unchanged upon immobilization on collagen. However, the decay rate of Free-Gal activity increased to a greater degree with increasing temperature than that of the immobilized forms. As reported by Mateo et al. [6], multipoint covalent immobilization does not alter the immobilized enzyme rigidity. In this manner, the immobilization renders protection under adverse conditions.

Storage stability is an important characteristic to allow industrial applications of immobilized enzymes. Both derivatives retained more than 80% of their initial activity after 30 days of

Table 1 β -Galactosidase immobilization on collagen through different methods with protein loads from 10 to 300 mg g⁻¹ of support.

Protein load (mg.g ⁻¹ of support)	Col-HAc-Gal		Col-Glu-Gal		Col-Al-Gal		Col-Al-Glu-Gal	
	Yield (%)	Efficiency (%)	Yield (%)	Efficiency (%)	Yield (%)	Efficiency (%)	Yield (%)	Efficiency (%)
10	57.11 ± 7.46 ^{Ba}	108.49 ± 20.62 ^{AcD}	74.12 ± 7.64 ^{Ba}	97.18 ± 5.83 ^{Bb}	99.08 ± 0.87 ^{Aa}	95.18 ± 8.14 ^{Bbc}	98.51 ± 1.22 ^{Aa}	108.60 ± 8.99 ^{Aa}
20	57.52 ± 5.75 ^{Ba}	95.83 ± 11.61 ^{Ac}	63.86 ± 7.88 ^{Bab}	79.89 ± 7.59 ^{Bd}	99.56 ± 0.63 ^{Aa}	87.53 ± 6.70 ^{Bcd}	99.78 ± 0.31 ^{Aa}	93.59 ± 7.24 ^{Ab}
30	44.58 ± 7.55 ^{Bab}	115.89 ± 23.31 ^{Abc}	36.38 ± 9.21 ^{Bb}	112.92 ± 6.93 ^{ABa}	98.92 ± 1.33 ^{Aa}	107.78 ± 7.38 ^{ABa}	99.74 ± 0.20 ^{Aa}	115.67 ± 8.88 ^{Aa}
50	34.44 ± 4.48 ^{Bbc}	105.20 ± 24.53 ^{Ad}	33.28 ± 7.62 ^{Bb}	89.61 ± 6.81 ^{Bbc}	99.61 ± 0.17 ^{Aa}	84.24 ± 9.38 ^{Bd}	99.88 ± 0.01 ^{Aa}	87.61 ± 7.81 ^{Bb}
100	19.12 ± 4.98 ^{Bc}	111.08 ± 11.63 ^{Abcd}	22.47 ± 5.14 ^{Bb}	97.62 ± 8.09 ^{Bcb}	95.30 ± 4.31 ^{Aa}	102.35 ± 9.05 ^{Bab}	96.54 ± 2.35 ^{Aa}	89.84 ± 6.8 ^{Cb}
200	22.71 ± 7.26 ^{Bc}	135.98 ± 17.60 ^{Aa}	23.83 ± 1.35 ^{Bb}	88.54 ± 2.9 ^{Cc}	94.84 ± 5.00 ^{Aa}	101.45 ± 4.89 ^{Bab}	97.92 ± 2.28 ^{Aa}	92.44 ± 9.2 ^{Cb}
300	27.74 ± 3.21 ^{Bbc}	117.85 ± 5.68 ^{Ab}	23.81 ± 4.80 ^{Bb}	90.34 ± 5.66 ^{Bbc}	93.97 ± 3.61 ^{Aa}	83.05 ± 7.35 ^{Bd}	96.42 ± 1.45 ^{Aa}	88.40 ± 4.23 ^{Bb}

Each value represents the mean of three independent experiments performed in duplicate with the average standard deviation. The same uppercase letter indicates that the immobilization parameter is statistically equal ($p < .05$) for the different derivatives. The same lowercase letter indicates that the immobilization parameter is statistically equal ($p < .05$) for the different protein loads for each derivative.

Table 2 β -Galactosidase immobilization on collagen, employing aluminum as a metal chelate and with protein loads from 500 to 1200 mg g⁻¹ of support.

Protein load (mg.g ⁻¹ of support)	Col-Al-Gal		Col-Al-Glu-Gal	
	Yield (%)	Efficiency (%)	Yield (%)	Efficiency (%)
500	97.99 ± 0.76 ^{Aa}	118.43 ± 5.74 ^{Aa}	97.37 ± 2.18 ^{Aa}	111.54 ± 6.34 ^{Aab}
600	97.00 ± 2.56 ^{Aa}	123.67 ± 3.75 ^{Aa}	95.91 ± 5.07 ^{Aa}	108.69 ± 3.65 ^{Babc}
800	89.82 ± 0.30 ^{Aab}	105.54 ± 4.78 ^{Aa}	92.72 ± 3.85 ^{Aab}	113.42 ± 5.23 ^{Aa}
1000	83.42 ± 5.66 ^{Aab}	99.41 ± 7.21 ^{Aa}	88.78 ± 4.22 ^{Aab}	99.59 ± 4.97 ^{Ac}
1200	71.27 ± 4.45 ^{Ab}	99.51 ± 5.37 ^{Aa}	77.42 ± 5.92 ^{Ab}	102.64 ± 3.21 ^{Abc}

Each value represents the mean of three independent experiments performed in duplicate with the average standard deviation. The same uppercase letter indicates that the immobilization parameter is statistically equal ($p < .05$) for the different derivatives. The same lowercase letter indicates that the immobilization parameter is statistically equal ($p < .05$) for the different protein loads for each derivative.

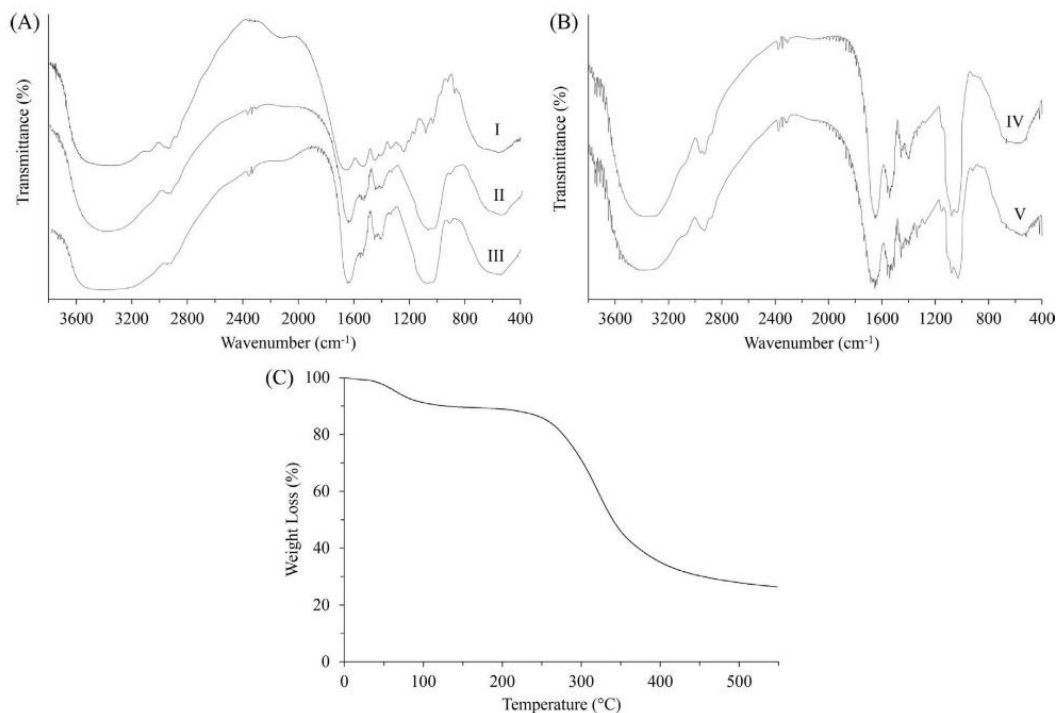


Fig. 2. Characterization of the supports and of the derivatives: (A and B) FTIR spectra of (I) collagen, (II) Col-Al, (III) Col-Al-Glu, (IV) Col-Al-Gal, and (V) Col-Al-Glu-Gal; (C) thermogravimetric analysis of the collagen.

storage at 4 °C in sodium acetate buffer (100 mM, pH 4.5). After 3 months, the enzyme activities were 60.33 and 62.07% of their initial values for Col-Al-Gal and Col-Al-Glu-Gal, respectively. These stabilities can be attributed to the interactions between the enzyme molecules attached to collagen by the aluminum [14].

The kinetic parameters for the free and immobilized β -galactosidases are presented in Table 3. The K_M values after enzyme immobilization on Col-Al-Gal and Col-Al-Glu-Gal increased 1.3- and 1.8-fold, respectively. On the other hand, the V_{max} for both immobilized biocatalysts decreased to approximately

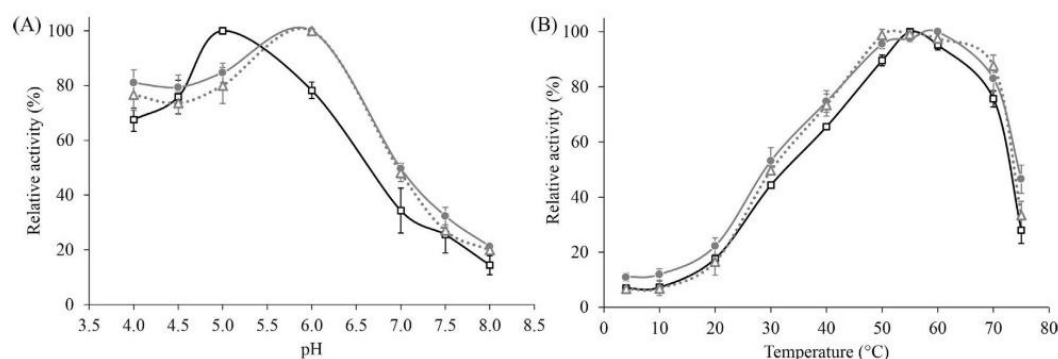


Fig. 3. Activity profiles of free and immobilized β -galactosidases at different (A) pH values and (B) temperatures. Relative activity refers to the activity/maximum activity. (\square) Free-Gal; (\bullet) Col-Al-Gal; (\triangle) Col-Al-Glu-Gal.

Table 3

Michaelis-Menten parameters of the free and immobilized β -galactosidases.

Derivative	K_M (mM)	V_{max} (mM \cdot min $^{-1}$)	k_{cat} (min $^{-1}$)	Constant of catalytic specificity ^a (mM $^{-1}$ min $^{-1}$)
Free-Gal	3.86 ± 0.30^b	164.02 ± 3.64^a	141.40 ± 3.14^a	36.64 ± 2.64^a
Col-Al-Gal	5.02 ± 0.70^b	142.99 ± 4.00^b	148.64 ± 4.16^a	29.61 ± 0.75^b
Col-Al-Glu-Gal	6.91 ± 0.74^a	144.55 ± 6.27^b	140.94 ± 6.12^a	20.40 ± 1.41^c

The values with different letters in each column are significantly different ($p < .05$). ^a (k_{cat}/K_M).

Table 4

Parameters of thermal inactivation of free and immobilized β -galactosidases.

Derivative	65 °C			68 °C			70 °C			73 °C		
	k (min $^{-1}$)	$t_{1/2}$ (min)	SF	k (min $^{-1}$)	$t_{1/2}$ (min)	SF	k (min $^{-1}$)	$t_{1/2}$ (min)	SF	k (min $^{-1}$)	$t_{1/2}$ (min)	SF
Free-Gal	0.0708	9.79	–	0.1363	5.09	–	0.3019	2.30	–	0.3866	1.79	–
Col-Al-Gal	0.0473	14.65	1.50	0.1261	5.50	1.08	0.2946	2.35	1.02	0.3577	1.94	1.08
Col-Al-Glu-Gal	0.0571	12.14	1.24	0.1004	6.90	1.36	0.2969	2.33	1.02	0.3417	2.03	1.13

SF = Stabilization Factor.

21 mMmin $^{-1}$. While the V_{max} and k_{cat} values do not significantly differ between the immobilized enzymes, the values of K_M and the catalytic specificity constant differ ($p < .05$). These results showed that the direct binding of aluminum to β -galactosidase provided better accessibility of the substrate to the active site and that the glutaraldehyde acted as a spacer arm [35].

Differences in the kinetic parameters of derivatives from their free enzyme values were also reported by Song et al. [14]. These authors verified an increase in K_M from 23.3 to 30.2 mM and a decrease in V_{max} from 3.5×10^4 to 1.3×10^4 U/mg after the immobilization of catalase on collagen modified with Zr(IV). These changes in kinetic parameters were attributed to several factors, including protein conformational changes induced by chelate formation with collagen, steric hindrance, and possible changes in the microenvironment around the bound enzyme [36].

Thermal stability was assessed, by thermal (Table 4) and thermodynamic (Table 5) parameters, to investigate the applicability of the immobilized enzyme at industrial scales. All derivatives exhibited $t_{1/2}$ values higher than that of the free enzyme (Table 4). The kinetic deactivation constant decreased after immobilization, increasing the SF of Col-Al-Gal and Col-Al-Glu-Gal to values greater than 1.0 at all tested temperatures. The immobilized enzymes exhibited similar thermal parameters, indicating that the use of glutaraldehyde in making Col-Al-Glu-Gal does not affect enzyme thermal stability. The bond between the amino terminal groups of enzymes in the glutaraldehyde derivatives may not provide sufficient rigidity for the tertiary structure to promote greater thermal stability [8]. The higher thermal stability in the derivatives reflected in the thermal inactivation parameters could be attributed to the

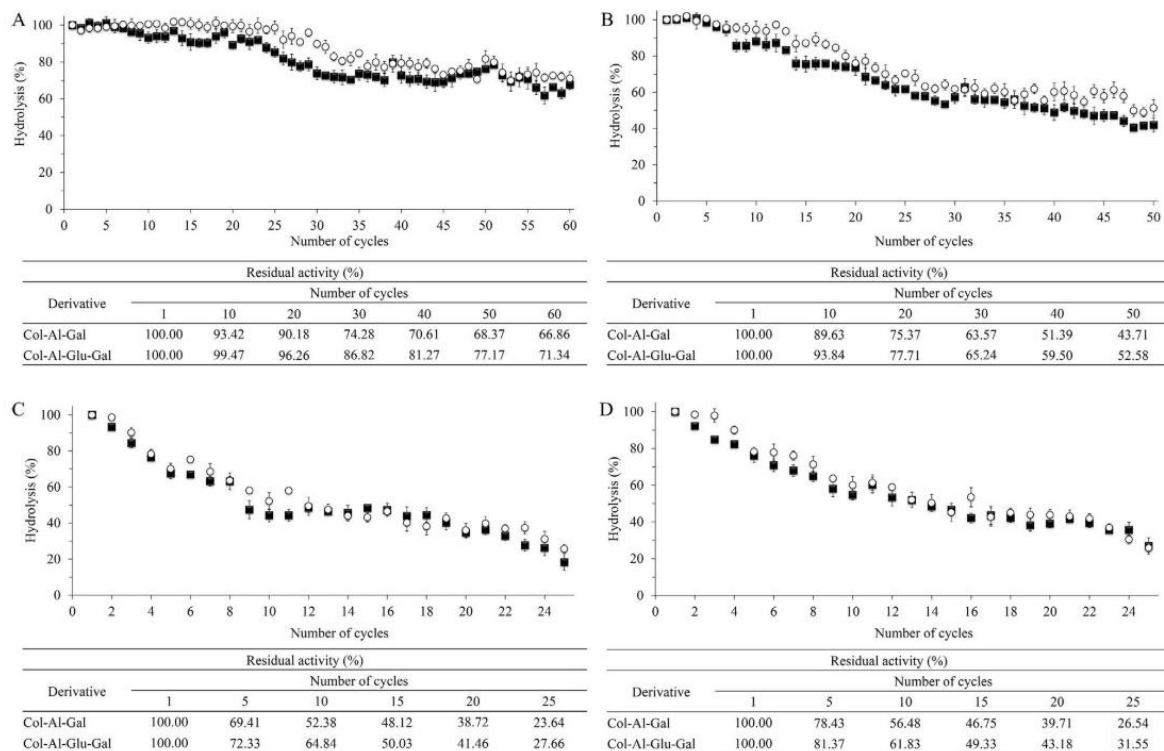
high reactivity of the aluminum with the enzyme and collagen groups. In addition, the collagen might adjust its conformation to accommodate and stabilize the dimensions of the enzyme [9].

No difference was observed between the E_a values of the free and immobilized forms. The ΔG values (Table 5) of the immobilized β -galactosidase were higher than those of the free enzyme, which shows that the immobilized derivative has greater thermal stability. The decrease in the Gibbs free energy (ΔG) at higher temperatures can be related to the decrease in the availability of reactive sites through denaturation and conformational changes [37]. The enthalpy (ΔH) and entropy (ΔS) represent changes in heat and disorder, respectively. The number of broken non-covalent bonds and the disorder associated with transition state formation are reflected by these parameters [38]. The ΔH values were lower for both Col-Al-Gal and Col-Al-Glu-Gal after the immobilization than the free enzyme. Furthermore, the enthalpy change for the enzyme was not temperature-dependent within the range studied since these values did not change with increases in temperature. The ΔS values increased with increased the temperature for both free and immobilized β -galactosidases. All the evaluated systems exhibited negative entropy changes, indicating that the aggregation of partially unfolded enzyme molecules is the rate-limiting step during thermal deactivation [39]. The thermodynamic parameters indicated that the immobilization of β -galactosidase on collagen contributed to the reduction in the enzyme's susceptibility to denaturation [40].

The immobilized β -galactosidases were used in batch processes for the hydrolysis of lactose in solutions of lactose, whey permeate, cheese whey and milk (Fig. 4). Their reusabilities were higher in lactose solution: after the 60th cycle, the immobilized enzymes

Table 5
Thermodynamic parameters of free and immobilized β -galactosidases.

Derivative	Ea	65 °C			68 °C			70 °C			73 °C		
		ΔG	ΔH	ΔS	ΔG	ΔH	ΔS	ΔG	ΔH	ΔS	ΔG	ΔH	ΔS
Free-Gal	10.69	102.08	7.88	−278.69	101.15	7.86	−273.60	99.50	7.84	−267.22	99.68	7.82	−265.50
Col-Al-Gal	10.46	103.21	7.65	−282.73	101.37	7.62	−274.92	99.56	7.61	−268.10	99.90	7.58	−266.82
Col-Al-Glu-Gal	9.60	102.68	6.79	−283.70	102.02	6.77	−279.34	99.54	6.75	−270.53	100.03	6.72	−269.68

Ea (kJ mol^{−1}); ΔG (kJ mol^{−1}); ΔH (kJ mol^{−1}); ΔS (J.mol^{−1} K^{−1}).**Fig. 4.** Reusability of immobilized β -galactosidases in the hydrolysis of lactose: (■) Col-Al-Gal; (○) Col-Al-Glu-Gal. The hydrolysis of lactose was performed in solutions of (A) lactose, (B) whey permeate, (C) cheese whey, and (D) skim milk, all of which were reconstituted to 5% w/v lactose. The residual activity and the degree of hydrolysis of each derivative directly after the first cycle were defined as 100% of the activity and hydrolysis, respectively, and the changing activity and hydrolysis were monitored during the reuse cycles.

retained approximately 70% of their initial activity, and the hydrolysis yields were approximately 60 and 80% for Col-Al-Gal and Col-Al-Glu-Gal, respectively. Batch application in permeate was also highly reusable, retaining more than 40% of the initial activity after 50 cycles, while the hydrolysis level was approximately 40 and 50%, for Col-Al-Gal and Col-Al-Glu-Gal, respectively. The stabilities of the derivatives sharply decrease in cheese whey and milk, but both biocatalysts were successfully reused 25 times. The hydrolysis of lactose (graphs) and the residual activity (tables) behaved similarly in both derivatives in all tested solutions. The decrease in stability in cheese whey and milk can be attributed to the constituents of these products, which may inhibit β -galactosidase activity [41,42]. The two derivatives behave similarly in all the tested substrates, showing that the crosslinking caused by glutaraldehyde addition was not the factor responsible for operational stability. The combination of the chelate formed with aluminum and the possibility that collagen adjusts its conformation to accommodate the enzyme were the key factors in biocatalyst stabilization [9].

4. Conclusion

In this study, we immobilized *Aspergillus oryzae* β -galactosidase on collagen treated with four different methods, generating the derivatives Col-HAc-Gal, Col-Glu-Gal, Col-Al-Gal, and Col-Al-Glu-Gal. The best yields and efficiencies were obtained employing aluminum as a metal chelate. The efficiency of the processes was higher than 99%, with protein loads on Col-Al-Gal and Col-Al-Glu-Gal ranging from 500 to 1,200 mg.g^{−1} of support. The temperature profiles of free and immobilized (Col-Al-Gal and Col-Al-Glu-Gal) enzymes were similar, while the optimum pH value changed from 5.0 to 6.0 after immobilization. The kinetic parameters were influenced by the immobilization, resulting in higher K_M values and slower reaction velocities. Enzyme susceptibility to denaturation was reduced in both immobilized biocatalysts. The derivatives Col-Al-Gal and Col-Al-Glu-Gal were used in the lactose hydrolysis of permeate and lactose solutions for 50 and 60 cycles, respectively, maintaining high values of enzymatic activity. Collagen is a promising low-cost support because of its increased protein load capacity and high number of reuses in batch processes.

Acknowledgements

We acknowledge CNPq, CAPES, and FAPERGS for the scholarships and Univates for the financial support of this research paper. We also thank the Prozyn Company for the enzyme donation.

References

- [1] D.F.M. Neri, V.M. Balcão, M.G.C. Cunha, L.B. Carvalho Jr., J.A. Teixeira, *Catal. Commun.* 9 (2008) 2334–2339.
- [2] N. Vasileva, Y. Ivanov, S. Damyanova, I. Kostova, T. Godjevargova, *Int. J. Biol. Macromol.* 82 (2016) 339–346.
- [3] C.Z. Guidini, J. Fischer, L.N.S. Santana, V.L. Cardoso, E.J. Ribeiro, *Biochem. Eng. J.* 52 (2010) 137–143.
- [4] Q. Husain, *CRC Crit. Rev. Biotechnol.* 30 (2010) 41–62.
- [5] S.A. Ansari, Q. Husain, *Biotechnol. Adv.* 30 (2012) 512–523.
- [6] C. Mateo, J.M. Palomo, G. Fernandez-Lorente, J.M. Guisan, R. Fernandez-Lafuente, *Enzyme Microb. Technol.* 40 (2007) 1451–1463.
- [7] T.C. de Souza, T.D.S. Fonseca, J.A. da Costa, M.V.P. Rocha, M.C. de Mattos, R. Fernandez-Lafuente, L.R.B. Gonçalves, J.C.S. dos Santos, *J. Mol. Catal. B Enzym.* 130 (2016) 58–69.
- [8] T.M. de Souza Bezerra, J.C. Bassan, V.T. de Oliveira Santos, A. Ferraz, R. Monti, *Process Biochem.* 50 (2015) 417–423.
- [9] X. Liao, H. Ma, R. Wang, B. Shi, *J. Memb. Sci.* 243 (2004) 235–241.
- [10] A.A. Karim, R. Bhat, *Trends Food Sci. Technol.* 19 (2008) 644–656.
- [11] M.C. Gómez-Guillén, B. Giménez, M.A. López-Caballero, M.P. Montero, *Food Hydrocoll.* 25 (2011) 1813–1827.
- [12] A.X. Lu, X.P. Liao, R.Q. Zhou, B. Shi, *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.* 301 (2007) 85–93.
- [13] S. Chen, N. Song, X. Liao, B. Shi, *Chin. J. Biotechnol.* 27 (2011) 1076–1081.
- [14] N. Song, S. Chen, X. Huang, X. Liao, B. Shi, *Process Biochem.* 46 (2011) 2187–2193.
- [15] P.M. Lin, J.R. Giacín, J.G. Leeder, S.G. Gilbert, S.S. Wang, *J. Food Sci.* 41 (1976) 1056–1062.
- [16] G. Ellenrieder, M. Daz, *Biocatal. Biotransfor.* 14 (1996) 113–123.
- [17] C. Bertrand, P.R. Coulet, D.C. Gautheron, *Anal. Chim. Acta* 126 (1981) 23–34.
- [18] J.R. Giacín, J. Jakubowski, J.G. Leeder, S.G. Gilbert, D.H. Kleyn, *J. Food Sci.* 39 (1974) 751–754.
- [19] D.H. Strumeyer, A. Constantinides, J. Freudenberger, *J. Food Sci.* 39 (1974) 498–502.
- [20] M.P. Mariotti, H. Yamanaka, A.R. Araujo, H.C. Trevisan, *Braz. Arch. Biol. Technol.* 51 (2008) 1233–1240.
- [21] R.A. Sheldon, S. van Pelt, *Chem. Soc. Rev.* 42 (2013) 6223–6235.
- [22] M.M. Bradford, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248–254.
- [23] B.A. Kikani, S.P. Singh, *Int. J. Biol. Macromol.* 81 (2015) 450–460.
- [24] Y. Wine, N. Cohen-Hadar, A. Freeman, F. Frolow, *Biotechnol. Bioeng.* 98 (2007) 711–718.
- [25] R. DiCosimo, J. McAuliffe, A.J. Poulou, G. Bohlmann, *Chem. Soc. Rev.* 42 (2013) 6437–6474.
- [26] N.A. Evans, B. Milligan, K.C. Montgomery, *J. Am. Leather Chem. As.* 82 (1987) 86–95.
- [27] M. Wang, H. Shi, D. Wu, H. Han, J. Zhang, Z. Xing, S. Wang, Q. Li, *Molecules* 19 (2014) 9838–9849.
- [28] L.L. Fernandes, C.X. Resende, D.S. Tavares, G.A. Soares, L.O. Castro, J.M. Granjeiro, *Polimeros* 21 (2011) 1–6.
- [29] A. Sionkowska, M. Wisniewski, J. Skopinska, C.J. Kennedy, T.J. Wess, *Biomaterials* 25 (2004) 795–801.
- [30] L. Wang, Q. Liang, Z. Wang, J. Xu, Y. Liu, H. Ma, *Food Chem.* 148 (2014) 410–414.
- [31] T. Mitra, G. Sailakshmi, A. Gnanamani, A.B. Mandal, *Mat. Res.* 16 (2013) 755–765.
- [32] K.J. Sreeram, J.R. Rao, B.U. Nair, T. Ramasami, *J. Am. Leather Chem. Assoc.* 95 (2000) 359–367.
- [33] M.M. Horn, V.C.A. Martins, A.M. de Guzzi Plepis, *Carbohydr. Polym.* 77 (2009) 239–243.
- [34] H. Liu, J. Liu, B. Tan, F. Zhou, Y. Qin, R. Yang, *Bioprocess Biosyst. Eng.* 35 (2012) 1287–1295.
- [35] H. Jiang, H. Zou, H. Wang, J. Ni, Q. Zhang, Y. Zhang, *J. Chromatogr. A* 903 (2000) 77–84.
- [36] D.C. Sheu, P.J. Lio, S.T. Chen, C.T. Lin, K.J. Duan, *Biotechnol. Lett.* 23 (2001) 1499–1503.
- [37] G. da Silva Campello, R.A. Trindade, T.V. Rêgo, J.F. de Medeiros Burkert, C.A.V. Burkert, *Int. J. Food Eng.* 8 (2012) 24.
- [38] Ö. Alptekin, S.S. Tükel, D. Yıldırım, D.J. Alagöz, *Mol. Catal. B, Enzym.* 64 (2010) 177–183.
- [39] S.N. Gummadu, *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 8 (2003) 9–18.
- [40] E. Aguiar-Oliveira, F. Maugeri, *Braz. J. Chem. Eng.* 28 (2011) 363–372.
- [41] C.S. Chen, C.K. Hsu, B.H. Chiang, *Process Biochem.* 38 (2002) 801–808.
- [42] M.L. Verma, C.J. Barrow, J.F. Kennedy, M. Puri, *Int. J. Biol. Macromol.* 50 (2012) 432–437.

4.3 Hydrolysis of lactose by *Kluyveromyces lactis* β -galactosidase immobilized on Immobead: catalytic and operational characterization. Artigo em preparação.

**Hydrolysis of lactose by *Kluyveromyces lactis* β -galactosidase immobilized on Immobead:
catalytic and operational characterization**

Adriano Gennari^{1,2}, Francielle Herrmann Mobayed^{1,2}, Ruan da Silva Rafael^{1,2}, André Luis Catto³, Edilson Valmir Benvenutti⁴, Rafael C. Rodrigues⁵, Raul Antonio Sperotto², Giandra Volpato⁶, Claucia Fernanda Volken de Souza^{1,2,3*}

¹Laboratório de Biotecnologia de Alimentos, ²Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, ³Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas, Universidade do Vale do Taquari - Univates, Lajeado, RS, Brazil.

⁴Instituto de Química, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

⁵Biotechnology, Bioprocess and Biocatalysis Group, Institute of Food Science and Technology, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

⁶Curso de Biotecnologia, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul - IFRS, Campus Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil.

* Corresponding Author. Laboratório de Biotecnologia de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade do Vale do Taquari - Univates, Av. Avelino Tallini, 171, ZC 95914-014, Lajeado, RS, Brazil. Phone: +55 51 3714 7000. Fax: +55 51 3714 7001. E-mail address: claucia@univates.br

Abstract

We investigated the immobilization of *Kluyveromyces lactis* β -galactosidase (Gal) on Immobead with different support modification strategies. Immobead was modified by a 1 M acid solution of $\text{H}_2\text{SO}_4\text{:HNO}_3$ (3:1) (Ibead-Ac), modified by 5% (w/v) glutaraldehyde (Ibead-Glu), and used in its unmodified form (Ibead). The immobilization yields and efficiencies were evaluated by testing protein loads from 10 to 200 mg.g^{-1} of support. The structural, textural and catalytic properties of the supports (modified and unmodified) and derivatives (Ibead-Gal, Ibead-Ac-Gal and Ibead-Glu-Gal) were analyzed. The highest immobilization yields and efficiencies were achieved with a protein load of 100 mg.g^{-1} of support. The surface area of Immobead was greatly decreased after the support modification. The pore area also decreased upon β -galactosidase immobilization. No changes were observed in the optimal pH and temperature conditions of pH 7.0 and 40 °C, respectively, after immobilization. The Michaelis constant of the immobilized β -galactosidase increased by 2.5, 3.3 and 2.1 times for Ibead-Gal, Ibead-Ac-Gal and Ibead-Glu-Gal, respectively, with respect to the free enzyme value (2.33 mM). The maximum velocity decreased from 30.7 mM.min^{-1} to approximately 11 mM.min^{-1} for the enzyme immobilized on Ibead and Ibead-Glu, respectively, and to approximately 22 mM.min^{-1} for the enzyme immobilized on Ibead-Ac-Gal. The derivatives had half-life values higher than those of the soluble enzyme at all tested temperatures. The three derivatives (Ibead-Gal, Ibead-Ac-Gal and Ibead-Glu-Gal) could be reused successfully at least 15 times, retaining high residual enzymatic activity, in batch processes for the hydrolysis of lactose in both cheese whey and milk. *K. lactis* β -galactosidase immobilized on Immobead by the tested treatments could be an alternative tool for lactose hydrolysis in the dairy industry.

Keywords: glutaraldehyde, acid solution, batch hydrolysis, yeast.

1 Introduction

The enzymatic hydrolysis of lactose is an important biotechnological process that can provide lactose-free products for consumption by lactose maldigesters [Haider and Husain, 2008]. A large fraction of the population shows low levels of the enzyme β -galactosidase in intestine, and excessive lactose in the intestines of such individuals can lead to tissue dehydration, poor calcium absorption and fermentation of the lactose by microflora. The development of products whose lactose content is pre-hydrolyzed can reduce the problems associated with lactose intolerance in individuals [Bayramoglu et al. 2007]. In addition, industrially, this hygroscopic sugar can cause many defects in refrigerated dairy foods, such as crystallization and the development of a sandy texture. Lactose hydrolysis can reduce the sensorial defects in these products [Panesar et al. 2006].

The enzyme β -galactosidase catalyzes the hydrolysis of lactose into glucose and galactose [Vasiljevic, 2001]. This biocatalyst can be obtained from a wide variety of microorganism, plant, and animal sources. However, the optimum catalytic properties, pH and temperature of the enzyme differ markedly with its source. Protein provided by microorganisms offers various advantages such as easy handling, a higher multiplication rate, and high production yield [Klewicki, 2007]. The β -galactosidase produced by *Kluyveromyces lactis* yeast is a homotetrameric protein with a molecular weight of approximately 118 kD per subunit [Pereira-Rodriguez et al., 2012]. This enzyme is most commonly employed for the hydrolysis of lactose in milk, sweet whey and neutral pH dairy products, since its optimum pH is between 6.5-7.0. In addition, this enzyme is widely accepted as safe for use in foods [Panesar 2010].

However, these biocatalysts generally have a high industrial cost, and their recovery at the end of the reaction process is not economically viable. Accordingly, several technologies for the use of this enzyme in lactose hydrolysis have been studied, such as application in batch reactors, packaged bed reactors, recycle reactors and fluidized bed reactors [Panesar, 2010]. Enzymatic immobilization acts in concert with these processes, facilitating the application of the enzyme.

An enzyme may be used in an immobilized form for various reasons, such as convenient separation from the product, the possibility of enhanced stability under both storage and operational conditions, and improved enzyme performance via repeated reuse [Sheldon, 2007]. For these purposes, many enzymes have been immobilized on both organic and inorganic supports via adsorption, covalent attachment, chemical aggregation, microencapsulation, and entrapment [Husain, 2010]. These immobilized biocatalysts can be

used in various areas such as industrial, biotechnological, medical, analytical, and various other applications [Bayramoglu et al. 2007]. Immobead 150 is an epoxy support with a high surface area formed by cross-linked copolymers of methacrylate bearing oxirane groups. It has been employed to immobilize different enzymes by taking advantage of their capacity to adsorb or to form covalent linkages [Matteo, 2007; Alagoz, 2016; Matte, 2016]. Nevertheless, the use of Immobead for the immobilization of a yeast β -galactosidase for use in the lactose hydrolysis of milk and dairy products in the food industry has not yet been established.

This paper describes the immobilization of *K. lactis* β -galactosidase on Immobead. We examined the modification of the support with an acid solution or glutaraldehyde and the use of its unmodified form to evaluate the derivatives produced by different interactions. The preparations were assessed by textural and structural analysis. The biocatalysts were characterized in terms of their optimum catalytic conditions, kinetic parameters, and thermal and operational stability.

2 Materials and Methods

2.1. Materials

The enzyme β -galactosidase (Gal) from *K. lactis* (Lactomax Pure) was purchased from Prozyn Company (São Paulo, Brazil). Powdered skim milk and powdered cheese whey were purchased from Brazil Foods S.A. (Rio Grande do Sul, Brazil). Powdered whey permeate was provided by Arla Foods (Córdoba, Argentina). The enzymatic kit for glucose determination was acquired from Labtest (Minas Gerais, Brazil). The Coomassie (Bradford) Protein Assay Kit, the support Immobead 150, ortho-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside (ONPG), and other chemicals were purchased from Sigma Aldrich Co. (St. Louis, USA). All of the other reagents were of analytical grade.

2.2 Methods

2.2.1 Pretreatments of the support

The support Immobead 150 (Ibead) was pretreated by two different strategies: modification of the Immobead surface groups with glutaraldehyde (Ibead-Glu) and oxidation of the surface groups of the support with an acid solution (Ibead-Ac). To prepare Ibead-Glu, 50 mg of the support was suspended with 4 mL of a glutaraldehyde solution (5%, v/v) and stirred at 150 rpm for 8 h. Immobead 150 was also treated with an acid solution (Ibead-Ac). Briefly, 50 mg of support was mixed with 4 mL of an acid solution (3:1, v/v) of H_2SO_4 1 M and HNO_3

1 M and maintained at 150 rpm for 8 h. The treated supports were recovered by centrifugation (1,000 g, 4 °C for 5 min), washed with ultra-pure water to remove traces of the reagents, and stored in sodium phosphate buffer (100 mM, pH 7.0) until further use.

2.2.2 Immobilization of β -galactosidase on Immobead

The immobilization was carried out on both unmodified (Ibead) and modified supports (Ibead-Glu and Ibead-Ac). The enzyme was dissolved in the corresponding volume of sodium phosphate buffer (1 M, pH 7.0) to obtain concentrations equivalent to 10 to 200 mg of protein per gram of support. Briefly, the Immobead was mixed with the enzyme solution and shaken for 24 h at 30 °C. The supernatant was used for protein and activity determination to monitor the effect of immobilization. The immobilized β -galactosidase was separated by centrifugation (5,000 g, 4 °C, 5 min). Then, the derivatives formed by the reaction of the enzyme with the unmodified support (Ibead-Gal), the support modified with acid solution (Ibead-Ac-Gal) or the support modified with glutaraldehyde (Ibead-Glu-Gal) were washed twice with sodium phosphate buffer (100 mM, pH 7.0). The immobilization yield and immobilization efficiency were calculated according to Sheldon and Van Pelt [21]. Protein concentrations were determined by using the Bradford method [Bradford, 1976].

The immobilization yield and efficiencies were analyzed by using one-way analysis of variance (ANOVA), and the F test was performed to evaluate the significance of the model. Differences in the Tukey test were considered significant at a level of 95% ($p < 0.05$), as calculated by the BioEstat5.0 software.

2.2.3 Determination of β -galactosidase activity

The activities of free and immobilized β -galactosidase were assayed by the ONPG method. A suitably diluted enzyme solution was added to a solution of ONPG (18 mM in 100 mM sodium phosphate buffer, pH 7.0 with 5 mM magnesium chloride) at 37 °C. The reaction was conducted for 2 min and stopped by the addition of 1.5 mL of a sodium carbonate solution (2 M, pH 9.8). The activity was measured as the increase in the absorbance corresponding to the release of o-nitrophenol (molar extinction coefficient 4500 L.mol⁻¹.cm⁻¹ at 415 nm and pH 7) from the hydrolysis of ONPG. A unit of specific activity (IU) was defined as the amount of enzyme required to hydrolyze 1 mmol of ONPG per min at pH 7 and 37 °C.

2.2.4 Structural study of support and derivatives

The unmodified and modified supports and the derivatives were studied by infrared spectroscopy (IR) with a Shimadzu/IRAffinity-1 spectrometer. The infrared spectrum was obtained by using KBr pellets at room temperature with 45 accumulative scans and 4 cm⁻¹ resolution. Thermogravimetric analysis (TGA) curves of the unmodified (Ibead) and modified supports (Ibead-Ac, Ibead-Glu) and of the derivatives (Ibead-Gal, Ibead-Ac-Gal, and Ibead-Glu-Gal) were obtained with a Perkin-Elmer TGA 4000 instrument with a heating rate of 5 °C.min⁻¹ in a temperature range of 25-550 °C under a nitrogen atmosphere. The specific heat capacities (determined by *differential scanning calorimetry (DSC)*) of the unmodified and modified Immobead and the derivatives were measured with the Perkin-Elmer model 4000 instrument. The temperature range was varied from 25 to 400 °C with a 5 °C.min⁻¹ heating ramp with a nitrogen gas flow of 20 mL.min⁻¹ and a gas pressure of 3.4 bar.

2.2.5 Textural characterization

Textural characterization was performed by using N₂ adsorption-desorption isotherms at the boiling point of liquid N₂, with a Tristar Kr II 3020 Micromeritics instrument. The samples (Ibead, Ibead-Ac, Ibead-Glu, Ibead-Gal, Ibead-Ac-Gal, and Ibead-Glu-Gal) were previously degassed at 120 °C under vacuum for 12 h. The specific surface area was determined by the Brunauer, Emmett and Teller (BET) multipoint technique, and the pore size distribution was obtained by the Barret-Joyner-Halenda (BJH) and density functional theory (DFT) methods [Webb et al. 1997].

2.2.6 Biocatalyst properties

Different buffer systems were employed to study the optimal pH for the free and immobilized β -galactosidases. The activities of the free and immobilized forms were measured at 37 °C in 100 mM sodium phosphate and acetate buffers with pH ranging from 5.5 to 8.5. The optimal temperature was evaluated by varying the temperature from 4.0 to 55 °C in sodium phosphate buffer (100 mM, pH 7.0). The activity recorded at the optimum pH or temperature was taken as 100% activity, and the activities obtained at the other conditions were expressed as percentages of this optimum activity.

The Michaelis constant (K_M) and the maximum reaction rate (V_{max}) were calculated for free and immobilized β -galactosidase by using the Michaelis-Menten model and Lineweaver-Burk linearization. For this purpose, different concentrations of ONPG (3–18 mM) in 100 mM sodium phosphate buffer pH 7.0 were employed during the enzymatic reaction. The turnover

numbers (k_{cat}) of free and immobilized β -galactosidase were calculated by the relation of the maximum velocity and the total concentration of enzymes in the reaction medium. The catalytic specificity constant was calculated as the ratio between the turnover number (k_{cat}) and the Michaelis constant (K_M).

The thermal stability of the free and immobilized β -galactosidases was determined in terms of the loss in enzyme activity upon incubation at different temperatures. The samples were kept for certain periods of time at different temperatures (55, 58, 60 and 63 °C). The thermodynamic parameters were calculated according to a simplified deactivation model described in the literature [Kikani, 2015].

To calculate the energy of activation (E_a) for the inactivation process, we used nonlinear regression and considered the Arrhenius plot (Equation 1):

$$k = A \cdot e^{\frac{E_a}{R \cdot T}} \quad (1)$$

where k (min^{-1}) is the kinetic deactivation constant, A (min^{-1}) is the pre-exponential factor, E_a ($\text{J} \cdot \text{mol}^{-1}$) is the energy of activation, R ($8.314 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$) is the universal gas constant, and T (K) is the temperature.

The half-life ($t_{1/2}$) of the enzyme is defined as the time required for the enzyme to lose half of its initial activity. The half-life was estimated by using Equation 2:

$$t_{\frac{1}{2}} = \ln \frac{2}{k} \quad (2)$$

where $t_{1/2}$ (min) is the half-life, and k (min^{-1}) is the kinetic deactivation constant.

The stabilization factor (SF) at a specific temperature was calculated by dividing the half-life of each immobilized β -galactosidase by the half-life of free β -galactosidase.

The Gibbs free energy of thermal inactivation (ΔG) was calculated from the first-order rate constant of the inactivation process at different temperatures by Equation 3:

$$\Delta G = -R \cdot T \cdot \ln \left(\frac{k \cdot h}{k_B \cdot T} \right) \quad (3)$$

where R ($8.314 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$) is the universal gas constant, T (K) is the temperature, k (min^{-1}) is the kinetic deactivation constant, h ($6.6262 \times 10^{-34} \text{ J} \cdot \text{s}$) is the Planck constant, and k_B ($1.3806 \times 10^{-23} \text{ J} \cdot \text{K}^{-1}$) is the Boltzmann constant.

The enthalpy (ΔH) was calculated from the energy of activation ($\Delta H = E_a - RT$), and the entropy (ΔS) was calculated from the enthalpy and Gibbs free energy ($T\Delta S = \Delta H - \Delta G$).

2.2.7 Operational stability

The reusability of the immobilized β -galactosidase was determined by the hydrolysis of four different substrate solutions, a lactose solution, whey permeate, cheese whey, and skim milk (all prepared to 5% w/v of lactose), as follows: the immobilized enzyme (100 mg) was incubated with 10 mL of one of the solutions at 4 °C and 150 rpm for 30 min. Then, the enzyme was separated by centrifugation (5,000 g, 4 °C for 5 min), and its activity was assayed. A glucose oxidase kit was used with the supernatant to determine the lactose hydrolysis by the formation of glucose. After the activity assay, the enzyme was washed, and fresh substrate solution was added to initiate the next round. The residual activity of each derivative after the first cycle was taken as 100% activity. The degree of hydrolysis of each derivative after the first cycle was defined as 100% hydrolysis.

3 Results and Discussion

3.1 Immobilization of β -galactosidase on Immobead

The yield and efficiency of the immobilization of *K. lactis* β -galactosidase on Immobead were evaluated by measuring the variation in enzyme concentration in the supernatant during the immobilization process. The support was tested in its unmodified form and after treatment with glutaraldehyde or acid solution (Fig. 1). Table 1 shows the immobilization yields and efficiencies for each protein load and all Immobead preparations.

The immobilization yield was found to be 100% with a protein load of 10 mg.g⁻¹ of support. A protein load greater than 100 mg of protein per g of support resulted in a significant reduction in yield ($p < 0.05$). All three immobilization strategies gave efficiencies of at least 60%. Although the glutaraldehyde treatment had the lowest efficiency among the different treatments, its yields remained 100% until a loading of 100 mg of protein. Alagoz et al. [2016] studied the immobilization of *Candida methylica* formate dehydrogenase on similar supports containing short spacer arm aldehyde groups. Immobead 150 modified with glutaraldehyde was used to evaluate the covalent immobilization of the enzyme. Using 9.0 mg of protein in 1 g of modified support, the authors obtained a lower yield than ours (90%) but an efficiency higher than 100%. These different enzyme recovery behaviors may be attributed to non-covalent interactions in the immobilization of *Candida methylica* formate dehydrogenase on the inert moieties of Immobead along with the β -galactosidase, which increased the performance of the immobilized enzyme.

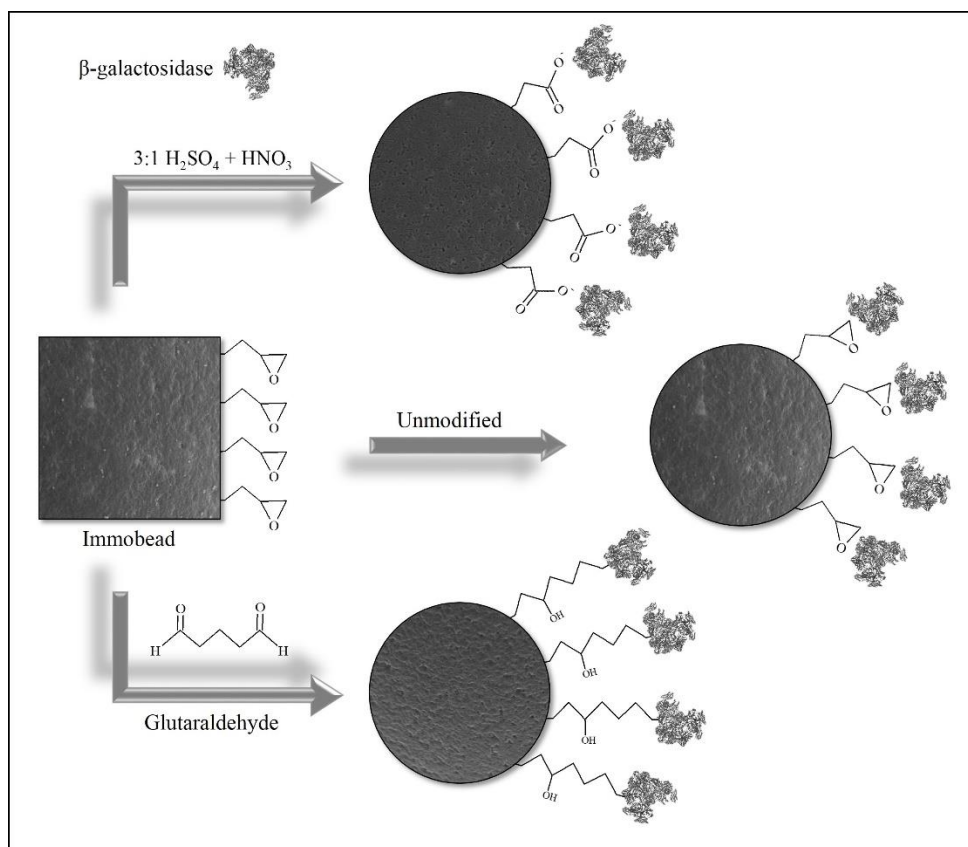


Fig. 1. Scheme for β -galactosidase immobilization on Immobead. MEV images of support modified by an acid solution, modified with glutaraldehyde and in its unmodified form.

Table 1. β -Galactosidase immobilized on Immobead. Protein loading study of the different support preparations.

Protein load (mg.g ⁻¹ of support)	Ibead-Gal		Ibead-Ac-Gal		Ibead-Glu-Gal	
	Yield (%)	Efficiency (%)	Yield (%)	Efficiency (%)	Yield (%)	Efficiency (%)
10	100.00 \pm 0.00 ^{A,a}	83.78 \pm 5.78 ^{A,a}	100.00 \pm 0.00 ^{A,a}	81.12 \pm 6.08 ^{A,a}	100.00 \pm 0.00 ^{A,a}	79.20 \pm 5.06 ^{A,a}
20	100.00 \pm 0.00 ^{A,a}	84.00 \pm 1.55 ^{A,a}	98.67 \pm 0.07 ^{B,a}	82.47 \pm 3.48 ^{A,a}	100.00 \pm 0.00 ^{A,a}	71.17 \pm 6.46 ^{B,ab}
30	97.14 \pm 0.73 ^{AB,ab}	77.55 \pm 4.35 ^{AB,a}	93.68 \pm 2.77 ^{B,a}	79.36 \pm 5.15 ^{A,a}	100.00 \pm 0.00 ^{A,a}	68.21 \pm 0.52 ^{B,ab}
50	95.85 \pm 2.47 ^{AB,ab}	79.92 \pm 1.27 ^{A,a}	92.21 \pm 4.39 ^{B,ab}	81.64 \pm 1.81 ^{A,a}	100.00 \pm 0.00 ^{A,a}	65.39 \pm 4.49 ^{B,ab}
100	93.02 \pm 1.73 ^{B,ab}	79.58 \pm 4.01 ^{A,a}	84.49 \pm 4.05 ^{C,ab}	74.18 \pm 3.26 ^{AB,a}	100.00 \pm 0.00 ^{A,a}	61.45 \pm 5.82 ^{B,b}
200	55.09 \pm 2.64 ^{B,c}	81.51 \pm 4.82 ^{A,a}	44.12 \pm 2.82 ^{C,c}	73.97 \pm 4.17 ^{A,a}	75.55 \pm 5.38 ^{A,b}	60.17 \pm 3.49 ^{B,b}

Each value represents the mean and the standard deviation of the mean of three independent experiments performed in triplicate. The same uppercase letter indicates that the immobilization parameter is statistically equal ($p < 0.05$) for the different derivatives. The same lowercase letter indicates that the immobilization parameter is statistically equal ($p < 0.05$) for the different protein loads for each derivative.

Ibead-Glu-Gal showed the highest yield among the protocols. The covalent interaction of glutaraldehyde with lysyl amine groups in β -galactosidase molecules, which in the tested condition drives the acid-base equilibrium and further reactions, was probably responsible for these results [Migneault et al. 2004]. Unlike Ibead-Gal, which was formed by adsorption, the Ibead-Ac-Gal derivative was formed by a nucleophilic attack on the oxirane groups of Immobead. This acid oxidation treatment was followed by stabilization of the carbocation by electrostatic interaction with the negative charges in the β -galactosidase side chains [Balasubramanian, 2005].

The immobilization process was continued for 24 h. The first bonds between β -galactosidase molecules and Immobead are formed quickly, but the subsequent bonds take longer to form because the protein becomes a barrier to the diffusion of further enzyme molecules [Gonçalves et al. 2008]. Therefore, longer contact times are needed to overcome the intra-particle diffusion effects caused by the presence of the enzyme inside the pores and allow more enzyme molecules to link to the support.

Considering the enzyme concentrations and the immobilization yield and efficiency results, preparations with protein loads of 100 mg.g⁻¹ of support were selected for the evaluation of their structural, textural and biocatalytic properties and their operational stability.

3.2 Structural study of preparations

The TGA curves of Ibead, Ibead-Ac and Ibead-Glu (Fig. 2A) showed a three-step weight loss: room temperature to 100 °C (approximately 5% wt), 100–350 °C (60% wt) and 350-700 °C (30% wt). The first step should be assigned to the thermal desorption of water physically adsorbed on the support surface; the second step resulted primarily from the loss of residual oxygen-containing oxirane groups; and the third step can be attributed to the complete oxidative decomposition of the Immobead. After immobilization, the derivatives exhibited an additional peak from ~320 to 450 °C, which is related to the decomposition of β -galactosidase.

The thermal properties of the Immobead and its derivatives were investigated by DSC (Fig. 2C and D). The three treated supports showed an endothermic peak at approximately 70 °C, which corresponds to the energy required to desorb water [Kittur et al. 2002]. The derivatives showed the same peak but at higher energy absorption. The second peak at ~350 °C is due to Immobead decomposition. The derivatives showed another endothermic peak at 200 °C, probably due to residual glycerol from the commercial enzyme [Sandu et al. 2015].

The IR spectrum of the materials (Fig. 2 E and F) exhibited a strong OH peak at $\sim 3000\text{ cm}^{-1}$ and also showed the presence of other functional groups such as CO (at 1727 cm^{-1}), COC (at 1230 cm^{-1}) and CO (at 1077 cm^{-1}). The treated supports exhibited a more intense epoxy peak (νCOC at 1230 cm^{-1}), while in the derivatives, this peak was reduced [Mondal, 2017]. The derivatives exhibited a higher peak intensity due to the use of the enzyme preparation, which contains buffer solution and glycerol.

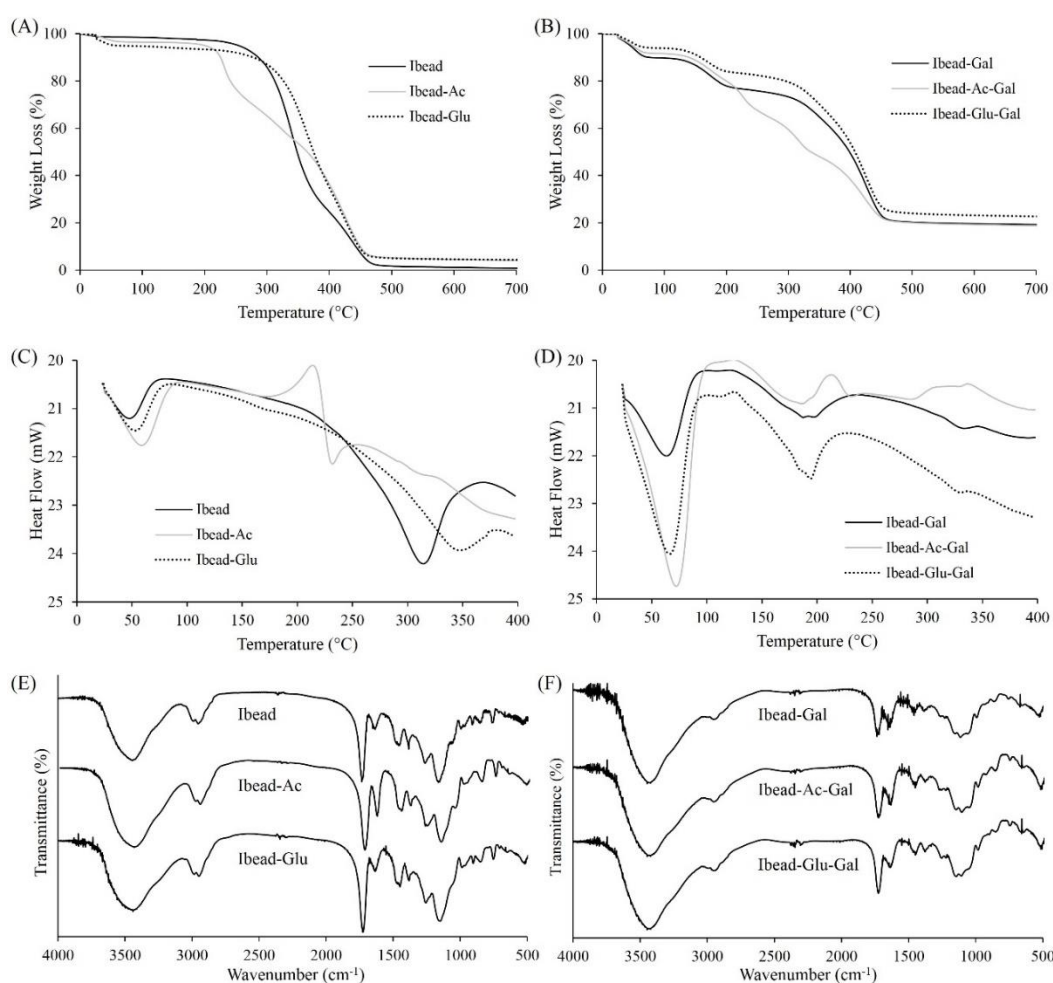


Fig. 2. Structural studies: TGA curves of (A) unmodified and modified Immobead (Ibead, Ibead-Ac and Ibead-Glu) and (B) derivatives (Ibead-Gal, Ibead-Ac-Gal and Ibead-Glu-Gal) TGA curves; DSC thermograms of (C) unmodified and modified Immobead (Ibead, Ibead-Ac and Ibead-Glu) and (D) derivatives (Ibead-Gal, Ibead-Ac-Gal and Ibead-Glu-Gal); and FT-IR spectra of (E) unmodified and modified Immobead (Ibead, Ibead-Ac and Ibead-Glu) and (F) derivatives (Ibead-Gal, Ibead-Ac-Gal and Ibead-Glu-Gal).

3.3 Textural Characteristics of Immobead preparations

The specific surface areas, pore diameters and volumes of unmodified Immobead (Ibead), modified Immobead (Ibead-Ac, Ibead-Glu) and their derivatives (Ibead-Gal, Ibead-Ac-Gal, and Ibead-Glu-Gal) obtained from nitrogen adsorption-desorption isotherms are summarized in Fig. 3.

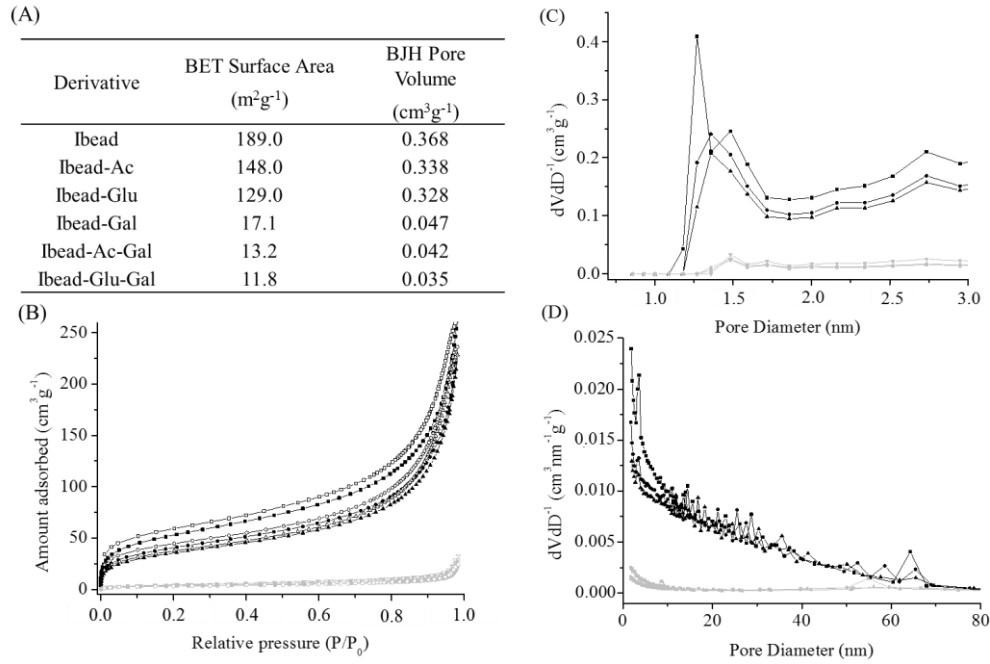


Fig. 3. Textural characterization of the supports: (A) surface area and pore volume; (B) N₂ adsorption (■, ●, ▲) and desorption (□, ○, △) isotherms; (C) DFT micropore size distribution; (D) BJH-pore size distributions of (■) Ibead, (●) □ Ibead-Ac, (▲) Ibead-Glu, (■) Ibead-Gal, (●) □ Ibead-Ac-Gal, and (▲) Ibead-Glu-Gal.

The main isotherm changes were observed in the microporous region, i.e., in the low relative pressure region. The support modifications decrease the specific surface area and the pore volume (Fig. 3A) compared to those of the unmodified Immobead. This change could be explained by the pore surface modification with glutaraldehyde [Caldas et al. 2017], by the partial blocking of the entrances to pores by the glutaraldehyde arms bonded to the support in Ibead-Glu [Wine et al. 2007] or by the carboxyl groups introduced onto the Immobead by oxidation with the acid solution in Ibead-Ac [Balasubramanian and Burghard 2005].

The immobilization of β -galactosidase on the supports (Ibead-Gal, Ibead-Ac-Gal and Ibead-Glu-Gal) caused a drastic decrease in the specific surface area (Fig. 3A) as well as in the amount of N₂ adsorption (Fig. 3B), confirmed by the decrease in the microporosity (Fig. 3C).

This effect was probably caused by the blocking of the smaller pores of the support by the immobilized biocatalyst [Matte et al. 2017]. Fig. 3D shows that Immobead also contained pores in the mesoporous region, which were greatly reduced after the immobilization. The observed reductions in the textural characteristics of the supports can be related to the protein load used in the derivatives (100 mg protein.g⁻¹ of support). Matte et al. [2017] immobilized lipase from *Thermomyces lanuginosus* on Immobead 150 by multipoint covalent attachment and verified a reduction in the specific surface area of the support from 137 to 63 m².g⁻¹ after immobilization.

3.4 Biocatalyst properties

The dependence of the immobilized β -galactosidase catalytic activity on pH and temperature was compared with that of the free enzyme. Fig. 4 shows the pH and temperature activity profiles for free and immobilized β -galactosidase. The immobilized enzyme showed no change in the pH-optimum profile (Fig. 4A) but exhibited a broadening in the basic-pH activity profiles compared to those of the native enzyme. This difference could be due to easier alteration/distortion of the free enzyme tertiary structure than the immobilized enzyme in highly acidic and basic solutions [Neri et al. 2008].

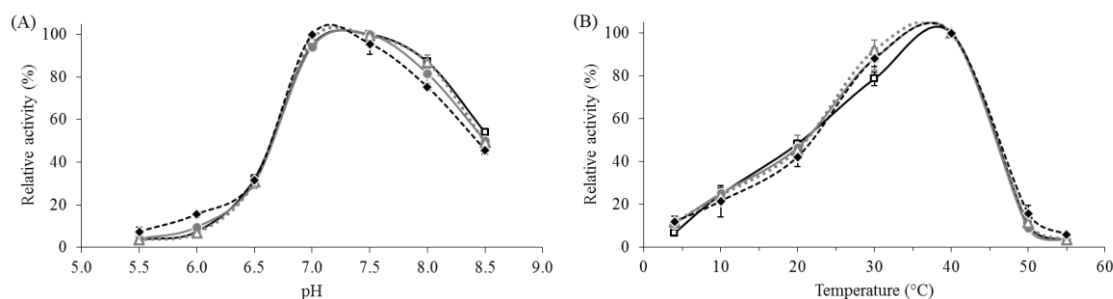


Fig. 4. pH (A) and temperature (B) activity profiles for soluble and immobilized β -galactosidase. Relative activity refers to the activity/maximum activity. (□) Free Gal; (●) Ibead-Gal; (△) Ibead-Ac-Gal and (◆) Ibead-Glu-Gal.

The activity of the free and immobilized enzyme increased with increasing temperature until reaching maximum activity at 40 °C. At higher temperatures, all the derivatives and the free enzyme lost almost 90% of their activity, indicating that elevated temperature leads to denaturation of the enzyme, rupturing the polypeptide chain of both β -galactosidase forms [Ansari et al. 2013]. According to Ansari and Husain [2011], as the catalytic activity of the enzyme depends on the conformational structure of the protein, even minor alterations in the tertiary structure can result in the loss of activity. Moreover, no

difference in the optimum pH and temperature conditions after enzyme immobilization was found by Ansari et al. [2013], who studied the immobilization of *Kluyveromyces lactis* β -galactosidase on glutaraldehyde-modified multiwalled carbon nanotubes.

Table 2 shows that enzyme immobilization resulted in increased K_m and decreased V_{max} values for all the derivatives. In this process, the binding of additional enzyme molecules leads to changes in the three-dimensional structure of the enzyme during immobilization and may also prevent access of the substrate to the active site. Furthermore, this effect is also attributed to lower transport of the substrate and products into and out of the modified Immobead [Dwevedi and Kayastha 2009]. Although the ionic interaction in Immobead-Ac-Gal resulted in the lowest affinity with Immobead, it presented the highest V_{max} , k_{cat} and catalytic specificity constant among the evaluated treatments. The covalent bond in Ibead-Glu-Gal preserved the affinity of the enzyme with the substrate better than the other derivatives, but its velocity was reduced 2.5-fold. The possibility has been reported that the hydrophobic interactions of the support with the enzyme might play an important role in the covalent immobilization and lead to changes in the enzyme structure or performance. In addition, hydrophobic interactions may alter the acidity constants of key substrate binding groups of the enzyme [Chaplin and Bucke 1990]. Changes in the kinetic parameters of the derivatives compared to those of free β -galactosidase were also reported by Wahba [2016], who verified an increase in k_m from 72.61 mM to 98.19 mM and a decrease in V_{max} from 22.99 to 9.51 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ enzyme after the immobilization of *A. oryzae* β -galactosidase on treated calcium pectinate beads.

Table 2. Kinetic parameters for soluble β -galactosidase and enzyme immobilized on the three prepared forms of Immobead.

Derivative	K_m (mM)	V_{max} (mM.min ⁻¹)	k_{cat} (min ⁻¹)	Catalytic specificity constant (min ⁻¹ mM ⁻¹)
Free Gal	2.33 \pm 0.08	30.74 \pm 1.73	184.41	79.12
Ibead-Gal	5.97 \pm 0.28	11.05 \pm 0.38	89.52	15.00
Ibead-Ac-Gal	7.68 \pm 1.33	22.39 \pm 3.74	214.39	27.91
Ibead-Glu-Gal	4.89 \pm 0.09	12.00 \pm 0.29	117.16	23.96

The thermal (Table 3) and thermodynamic (Table 4) parameters of free and immobilized β -galactosidases were examined to investigate the applicability of the immobilized enzymes on the industrial scale. The thermal inactivation constant (k) (Table 3) was decreased after immobilization in the three derivatives. As a result, the $t_{1/2}$ values of Ibead-Gal, Ibead-Ac-Gal and Ibead-Glu-Gal were higher than those of the free enzyme at all evaluated temperatures. Ibead-Glu-Gal was the most stable derivative, showing that the covalent bonds improved the rigidity and resistance to unfolding during heat treatment more than other immobilization interactions [Banjanac 2016].

The sensitivity of the reaction rate to temperature was determined by the Arrhenius activation energy (E_a) for free and immobilized β -galactosidases. No difference in this energy was found between the two enzyme forms (Table 4). The Gibbs free energy (ΔG) was higher for Ibead-Gal, Ibead-Ac-Gal and Ibead-Glu-Gal than for the free enzyme, which shows that in all these cases, the interactions with Immobead increased the thermal stability. Similarly, according to the half-life values, treatment with glutaraldehyde stabilized the enzyme structure. The enthalpy (ΔH), which represents the heat variation of the enzyme when incubated at the tested temperatures, decreased after the immobilization process. The lower enthalpy of the derivatives indicated that the number of broken non-covalent bonds was reduced. Furthermore, the enthalpy of the enzyme showed temperature dependence: as the temperature increased, a decrease in enthalpy was observed. The entropy of the system also changed, according to the values for free and immobilized β -galactosidases. The thermodynamic parameters indicated that the Immobead treatments followed by β -galactosidase immobilization contributed to reducing the susceptibility of the enzyme to denaturation [Aguar-Oliveira et al. 2011]. Working with another epoxy support, Campello et al. [2012] immobilized *Kluyveromyces lactis* β -galactosidase on Eupergit® C. The authors verified the same tendency as in our study in the ΔH and ΔS values, which increased after the immobilization process.

Table 3. Thermal inactivation properties of free and immobilized β -galactosidase.

Derivative	55 °C			58 °C			60 °C			63 °C		
	k (min ⁻¹)	<i>t</i> _{1/2} (min)	SF	k (min ⁻¹)	<i>t</i> _{1/2} (min)	SF	k (min ⁻¹)	<i>t</i> _{1/2} (min)	SF	k (min ⁻¹)	<i>t</i> _{1/2} (min)	SF
Free Gal	0.97	0.71	-	1.65	0.42	-	1.99	0.35	-	2.23	0.31	-
Ibead-Gal	0.68	1.02	1.43	1.26	0.55	1.30	1.56	0.44	1.27	1.91	0.36	1.17
Ibead-Ac-Gal	0.94	0.74	1.03	1.52	0.46	1.09	1.76	0.39	1.13	1.88	0.37	1.19
Ibead-Glu-Gal	0.46	1.50	2.11	0.60	1.16	2.77	0.75	0.93	2.67	1.78	0.39	1.25

SF = Stabilization factor.

Table 4. Thermodynamic stability of free and immobilized β -galactosidase.

Derivative	ΔE	55 °C			58 °C			60 °C			63 °C		
		ΔG	ΔH	ΔS	ΔG	ΔH	ΔS	ΔG	ΔH	ΔS	ΔG	ΔH	ΔS
Free Gal	2.61	91.84	-0.11	-280.34	91.25	-0.14	-276.09	91.29	-0.16	-274.62	91.83	-0.18	-273.83
Ibead-Gal	2.49	92.81	-0.24	-283.68	91.98	-0.27	-278.68	101.06	-0.28	-304.33	92.25	-0.31	-275.48
Ibead-Ac-Gal	2.50	91.92	-0.23	-280.93	91.47	-0.25	-277.11	91.63	-0.27	-275.97	92.30	-0.29	-275.59
Ibead-Glu-Gal	2.61	93.87	-0.12	-286.55	94.05	-0.15	-284.58	102.72	-0.16	-308.95	92.46	-0.19	-275.72

Ea (kJ.mol⁻¹); ΔG (kJ.mol⁻¹); ΔH (kJ.mol⁻¹); ΔS (J.mol⁻¹.K⁻¹).

3.5 Operational stability

The reuse potential of immobilized β -galactosidase in the hydrolysis of lactose from solutions of lactose, permeate, cheese whey, and milk was examined (Fig. 5). The results showed that the immobilized preparations maintained approximately 50% of their initial activity after being reused five times in lactose solution and ten times in permeate. The recovered activity values of the Ibead-Gal, Ibead-Ac-Gal and Ibead-Glu-Gal in permeate hydrolysis after the 10th cycle were almost 30% higher than those in lactose solution. For cheese whey and milk, the enzyme operational stability of the three derivatives was higher, presenting approximately 40% of lactose hydrolysis after 15 cycles of reuse. Several researchers, such as Ansari and Husain [2011] and Ustok et al. [2010] have reported that galactose, one of the end products of the β -galactosidase-catalyzed hydrolysis of lactose, competitively inhibited enzyme activity. The same tendency was observed in the hydrolysis of lactose (graphs) and in the residual activity of the enzyme (tables). These results suggested that β -galactosidase immobilization on Immobead greatly enhances resistance against competitive inhibition by galactose. Pessela et al. [2007] studied the immobilization of a thermophilic β -galactosidase on Sepabead supports and verified that the process decreased the product inhibition effect, which was attributed to the higher inhibition constants of the immobilized enzyme.

4. Conclusion

The immobilization of *K. lactis* β -galactosidase on Immobead revealed a stable enzyme-support interaction. The evaluated modifications to the Immobead (unmodified or modified with an acid solution or glutaraldehyde) confer different characteristics on the biocatalyst. The immobilization saturated the support surface with 100 mg of protein per g of Immobead, maintaining the higher yield and efficiency of the processes. The optimum pH and temperature of the enzyme did not alter after immobilization, but the thermal stability of all the derivatives was higher than that of the free enzyme. The kinetic parameters of the β -galactosidase were impacted by the bond with the support. The enzyme showed great stability in the reusability assays in different substrate solutions and could be reused 15 times for lactose hydrolysis in milk and cheese whey, maintaining approximately 40% of its initial activity. These results show that β -galactosidase immobilization protocols on Immobead could serve to facilitate the application of the enzyme in the dairy industry.

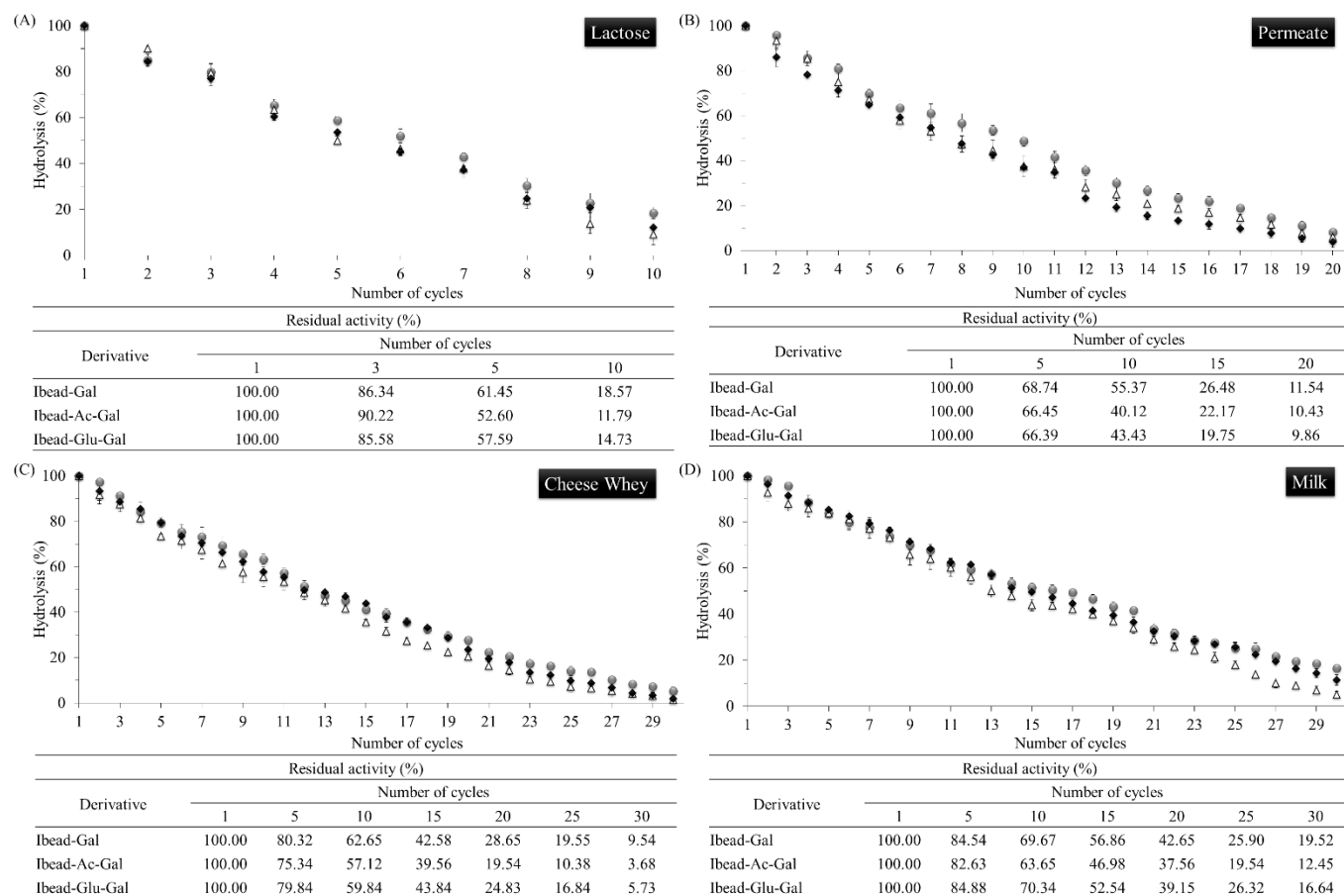


Fig. 5. Reusability of immobilized β -galactosidase for lactose hydrolysis. The activity determined during the first cycle was taken as the reference (100%) for the calculation of the remaining activity after each use. Lactose hydrolysis was performed in solutions of (A) lactose, (B) whey permeate, (C) cheese whey, and (D) skim milk, all reconstituted to contain 5% w/v of lactose. Symbols: (●) Ibead-Gal; (Δ) Ibead-Ac-Gal and (◆) Ibead-Glu-Gal.

Acknowledgements

We would like to thank Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) for the scholarships, and Universidade do Vale do Taquari - Univates for the financial support granted for this research paper. We would also like to thank the Prozyn Company for the enzyme donation.

Conflicts of interest

The authors declare they do not have any conflicts of interest.

References

- Aguiar-Oliveira, E., & Maugeri, F. (2011). Thermal stability of the immobilized fructosyltransferase from *Rhodotorula* sp. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 28(3), 363-372.
- Alagöz, D., Çelik, A., Yildirim, D., Tükel, S. S., & Binay, B. (2016). Covalent immobilization of *Candida methylica* formate dehydrogenase on short spacer arm aldehyde group containing supports. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 130, 40-47.
- Ansari, S. A., & Husain, Q. (2011). Bioaffinity based immobilization of almond (*Amygdalus communis*) β -galactosidase on Con A-layered calcium alginatecellulose beads: Its application in lactose hydrolysis in batch and continuous mode. *Iranian Journal of Biotechnology*, 9(4), 290-301.
- Ansari, S. A., & Husain, Q. (2011). Immobilization of *Kluyveromyces lactis* β galactosidase on concanavalin A layered aluminium oxide nanoparticles-its future aspects in biosensor applications. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 70(3), 119-126.
- Ansari, S. A., Satar, R., Chibber, S., & Khan, M. J. (2013). Enhanced stability of *Kluyveromyces lactis* β -galactosidase immobilized on glutaraldehyde modified multiwalled carbon nanotubes. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 97, 258-263.
- Balasubramanian, K., & Burghard, M. (2005). Chemically functionalized carbon nanotubes. *Small*, 1(2), 180-192.
- Banjanac, K., Carević, M., Ćorović, M., Milivojević, A., Prlainović, N., Marinković, A., & Bezbradica, D. (2016). Novel β -galactosidase nanobiocatalyst systems for application in the synthesis of bioactive galactosides. *RSC Advances*, 6(99), 97216-97225.

- Bayramoglu, G., Tunali, Y., & Arica, M. Y. (2007). Immobilization of β -galactosidase onto magnetic poly (GMA–MMA) beads for hydrolysis of lactose in bed reactor. *Catalysis Communications*, 8(7), 1094-1101.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Caldas, E. M., Novatzky, D., Deon, M., de Menezes, E. W., Hertz, P. F., Costa, T. M. H., & Benvenutti, E. V. (2017). Pore size effect in the amount of immobilized enzyme for manufacturing carbon ceramic biosensor. *Microporous and Mesoporous Materials*, 247, 95-102.
- Chaplin, M.F., Bucke, C. The preparation and kinetics of immobilised enzymes, in: M.F. Chaplin, C. Bucke (Eds.), *Enzyme Technology*, Cambridge University Press, 1990, pp. 80–136.
- da Silva Campello, G., Trindade, R. A., Rêgo, T. V., de Medeiros Burkert, J. F., & Burkert, C. A. V. (2012). Immobilization of β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* on Eupergit® C and Properties of the Biocatalyst. *International journal of food engineering*, 8(3).
- de Souza Bezerra, T. M., Bassan, J. C., de Oliveira Santos, V. T., Ferraz, A., & Monti, R. (2015). Covalent immobilization of laccase in green coconut fiber and use in clarification of apple juice. *Process Biochemistry*, 50(3), 417-423.
- Dwevedi, A., & Kayastha, A. M. (2009). Stabilization of β -galactosidase (from peas) by immobilization onto Amberlite MB-150 beads and its application in lactose hydrolysis. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(2), 682-688.
- Gonçalves, L. R. B., Ferreira, A. L. O., Fernandez-Lafuente, R., Guisan, J. M., Giordano, R. C., & Giordano, R. L. C. (2008). Influence of mass transfer limitations on the enzymatic synthesis of β -lactam antibiotics catalyzed by penicillin G acylase immobilized on glioxil-agarose. *Bioprocess and biosystems engineering*, 31(5), 411-418.
- Haider, T., & Husain, Q. (2009). Hydrolysis of milk/whey lactose by β galactosidase: a comparative study of stirred batch process and packed bed reactor prepared with calcium alginate entrapped enzyme. *Chemical engineering and processing: process intensification*, 48(1), 576-580.
- Husain, Q. (2010). β Galactosidases and their potential applications: a review. *Critical reviews in biotechnology*, 30(1), 41-62.

- Kikani, B. A., & Singh, S. P. (2015). Enzyme stability, thermodynamics and secondary structures of α -amylase as probed by the CD spectroscopy. *International journal of biological macromolecules*, 81, 450-460.
- Kittur, F. S., Prashanth, K. H., Sankar, K. U., & Tharanathan, R. N. (2002). Characterization of chitin, chitosan and their carboxymethyl derivatives by differential scanning calorimetry. *Carbohydrate polymers*, 49(2), 185-193.
- Klewicki, R. (2007). Formation of gal-sorbitol during lactose hydrolysis with β -galactosidase. *Food chemistry*, 100(3), 1196-1201.
- Mateo, C., Palomo, J. M., Fernandez-Lorente, G., Guisan, J. M., & Fernandez-Lafuente, R. (2007). Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme and microbial technology*, 40(6), 1451-1463.
- Matte, C. R., Bordinhão, C., Poppe, J. K., Benvenutti, E. V., Costa, T. M., Rodrigues, R. C., & Ayub, M. A. (2017). Physical-Chemical Properties of the Support Immobead 150 Before and After the Immobilization Process of Lipase. *J. Braz. Chem. Soc*, 28(8), 1430-1439.
- Matte, C. R., Bordinhão, C., Poppe, J. K., Rodrigues, R. C., Hertz, P. F., & Ayub, M. A. (2016). Synthesis of butyl butyrate in batch and continuous enzymatic reactors using *Thermomyces lanuginosus* lipase immobilized in Immobead 150. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 127, 67-75.
- Migneault, I., Dartiguenave, C., Bertrand, M. J., & Waldron, K. C. (2004). Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking. *Biotechniques*, 37(5), 790-806.
- Mondal, M. K., Mukherjee, S., Saha, S. K., Chowdhury, P., & Babu, S. P. S. (2017). Design and synthesis of reduced graphene oxide based supramolecular scaffold: A benign microbial resistant network for enzyme immobilization and cell growth. *Materials Science and Engineering: C*, 75, 1168-1177.
- Neri, D. F., Balcão, V. M., Carneiro-da-Cunha, M. G., Carvalho Jr, L. B., & Teixeira, J. A. (2008). Immobilization of β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* onto a polysiloxane–polyvinyl alcohol magnetic (mPOS–PVA) composite for lactose hydrolysis. *Catalysis Communications*, 9(14), 2334-2339.
- Panesar, P. S., Kumari, S., & Panesar, R. (2010). Potential applications of immobilized β -galactosidase in food processing industries. *Enzyme Research*, 2010.

- Panesar, P. S., Panesar, R., Singh, R. S., Kennedy, J. F., & Kumar, H. (2006). Microbial production, immobilization and applications of β -D-galactosidase. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 81(4), 530-543.
- Pereira-Rodríguez, Á., Fernández-Leiro, R., González-Siso, M. I., Cerdán, M. E., Becerra, M., & Sanz-Aparicio, J. (2012). Structural basis of specificity in tetrameric *Kluyveromyces lactis* β -galactosidase. *Journal of structural biology*, 177(2), 392-401.
- Pessela, B. C., Dellamora-Ortiz, G., Betancor, L., Fuentes, M., Guisán, J. M., & Fernandez-Lafuente, R. (2007). Modulation of the catalytic properties of multimeric β -galactosidase from *E. coli* by using different immobilization protocols. *Enzyme and Microbial Technology*, 40(2), 310-315.
- Sandu, T., Sarbu, A., Damian, C. M., Patroi, D., Iordache, T. V., Budinova, T., ... & Sirkecioglu, A. (2015). Functionalized bicomponent polymer membranes as supports for covalent immobilization of enzymes. *Reactive and Functional Polymers*, 96, 5-13.
- Sheldon, R. A. (2007). Enzyme immobilization: the quest for optimum performance. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 349(8-9), 1289-1307.
- Sheldon, R. A., & van Pelt, S. (2013). Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. *Chemical Society Reviews*, 42(15), 6223-6235.
- Ustok, F. I., Tari, C., & Harsa, S. (2010). Biochemical and thermal properties of β -galactosidase enzymes produced by artisanal yoghurt cultures. *Food Chemistry*, 119(3), 1114-1120.
- Vasiljevic, T., & Jelen, P. (2001). Production of β -galactosidase for lactose hydrolysis in milk and dairy products using thermophilic lactic acid bacteria. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2(2), 75-85.
- Wahba, M. I. (2017). Chitosan-glutaraldehyde activated calcium pectinate beads as a covalent immobilization support. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 12, 266-274.
- Webb, P. A., & Orr, C. (1997). Analytical Methods in Fine Particle Technology, Micromeritics Ins. Corp., USA.
- Wine, Y., Cohen-Hadar, N., Freeman, A., & Frolow, F. (2007). Elucidation of the mechanism and end products of glutaraldehyde crosslinking reaction by X-ray structure analysis. *Biotechnology and Bioengineering*, 98(3), 711-718.

4.4 Efeito da modificação química do colágeno nas propriedades estruturais e nas características catalíticas da enzima β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* imobilizada. Artigo em preparação.

Efeito da modificação química do colágeno nas propriedades estruturais e nas características catalíticas da enzima β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* imobilizada

Adriano Gennari¹, Francielle Herrmann Mobayed¹, Giandra Volpato², Claucia Fernanda Volken de Souza^{1*}

¹ Laboratório de Biotecnologia de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade do Vale do Taquari - UNIVATES, Lajeado, RS, Brasil.

² Curso de Biotecnologia, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul - IFRS, Campus Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brasil.

* Autor correspondente. Laboratório de Biotecnologia de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade do Vale do Taquari - UNIVATES, Av. Avelino Tallini, 171, CEP 95914-014, Lajeado, RS, Brasil. Fone: +55 51 3714 7000. Fax: +55 51 3714 7001. E-mail: claucia@univates.br

Resumo

A imobilização enzimática é uma técnica que viabiliza a utilização de enzimas, pois permite a recuperação, processos contínuos e facilidade na interrupção de reações catalíticas. O colágeno é uma proteína pouco solúvel, na sua forma natural organizada em fibras resistentes, e que possui diversos grupos funcionais, como -OH, -COOH, -CONH₂ e -NH₂, importantes para os processos de imobilização enzimática. O objetivo deste trabalho foi estudar o processo de imobilização da enzima β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* (Gal) em colágeno. Nos processos de imobilização foram empregados quatro diferentes tratamentos, utilizando alumínio (Collagen-Al), glutaraldeído (Collagen-Glu), ácido acético (Collagen-HAc) ou uma combinação das modificações com alumínio e glutaraldeído (Collagen-Al-Glu). Avaliou-se o efeito de diferentes cargas de enzima em relação à quantidade de colágeno (10 a 200 mg de proteína/g de suporte) nos parâmetros de rendimento e eficiência da imobilização. Os suportes modificados e as enzimas imobilizadas foram estruturalmente estudados através de análises termogravimétricas e espectroscopia de infravermelho. Os derivados, juntamente com a enzima livre, foram caracterizados quanto às condições operacionais de temperatura e pH e aos parâmetros cinéticos, e a enzima imobilizada foi aplicada na hidrólise da lactose presente no leite e no soro de queijo através da utilização de processos em batelada. Verificou-se que não houve redução significativa nos rendimentos de imobilização obtidos para as cargas de até 100 mg de proteína/g de suporte, com rendimentos de 67,37; 74,22; 73,44 e 74,63% para Collagen-Al-Gal, Collagen-Al-Glu-Gal, Collagen-HAc-Gal e Collagen-Glu-Gal, respectivamente. As condições ótimas de catálise não foram alteradas após a imobilização, sendo que as maiores atividades foram encontradas no pH 7,0 e na temperatura de 37 °C. Os derivados apresentaram um aumento na constante de Michaelis e uma redução na velocidade máxima de reação quando comparados à enzima livre. Todos os derivados após 17 ciclos de reuso na hidrólise da lactose presente no leite e no soro de queijo atingiram um percentual de hidrólise da lactose em torno de 50%. A β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* pode ser imobilizada em colágeno através dos tratamentos testados, apresentando condições catalíticas semelhantes à enzima livre.

Palavras-chave: alumínio, quelante, ácido acético, glutaraldeído.

1 INTRODUÇÃO

A enzima β -galactosidase, também chamada de lactase, vem sendo cada vez mais empregada na indústria de laticínios. Esse biocatalisador é empregado no desenvolvimento de produtos lácteos com baixos teores de lactose, além de contribuir para com as características sensoriais dos produtos lácteos. A enzima lactase pode ser obtida por diversas fontes, tais como microrganismos, plantas e animais. Devido às suas diferentes origens, essa enzima possui características diversas quanto às condições de hidrólise [Ladero et al., 2003; Zhang et al., 2010].

Apesar de apresentarem excelentes perspectivas na catálise de reações, o emprego destes biocatalisadores na indústria é limitado, pois geralmente possuem um custo elevado e sua recuperação após a aplicação não é economicamente viável [López-Gallego et al., 2005]. O processo de imobilização de enzimas vem sendo um método de grande interesse proposto para superar essas limitações, uma vez que permite estabilizar a estrutura da enzima e, conseqüentemente, sua atividade catalítica [Grosóvá et al., 2008]. Esta técnica facilita a utilização das enzimas nos mais diversos processos industriais, pois permite a recuperação do biocatalisador, a reutilização do suporte, redução de custos com processos contínuos e facilidade na interrupção das reações enzimáticas. Em alguns casos, pode também melhorar o desempenho do biocatalisador e reduzir a inativação da enzima por influência da temperatura e outros constituintes do produto [Jochems et al., 2011; Krajewska, 2004].

O suporte para imobilização deve ser inerte, biodegradável, de baixo custo e possuir grupos químicos na sua superfície que possam ser ativados ou modificados, permitindo a ligação da enzima sem desnaturá-la. Além disso, precisam ser quimicamente resistentes durante o processo de imobilização e às condições em que se realiza a reação [Mendes et al., 2011]. O colágeno é um polímero natural, facilmente obtido a partir de pele, ossos e tendões. Essa proteína é composta por três cadeias polipeptídicas com uma estrutura de tripla hélice [Song et al., 2011]. O colágeno é um tipo de material anfifílico maleável e, portanto é capaz de ajustar sua conformação quando ligado a outras estruturas químicas, que possuem diferentes propriedades hidrofílicas / hidrofóbicas [Liao et al., 2004]. Apesar de o colágeno já ter sido utilizado como suporte para diferentes enzimas, tais como catalase [Song et al., 2011], lisozima [Lu et al., 2007], β -galactosidase [Gennari et al., 2018] e naringinase [Ellenrieder e Daz, 1996], não foram encontrados relatos de sua aplicação como suporte para lactases obtidas a partir de leveduras.

O presente trabalho estudou o processo de imobilização da enzima β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* (Gal) em colágeno tratado por diferentes compostos. O suporte foi

modificado utilizando ácido acético, glutaraldeído, alumínio, ou uma combinação dos métodos com alumínio e glutaraldeído. Após a imobilização a enzima foi caracterizada quanto as suas condições ótimas de catálise, avaliada quanto a sua cinética de reação e aplicada na hidrólise da lactose presente no leite e no soro de queijo através da utilização em processos em batelada.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Ensaio de atividade enzimática

A atividade da enzima β -galactosidase livre e imobilizada foi realizada pela determinação da concentração de o-nitrofenol (*ortho-nitrophenol* - ONP) na reação com o substrato cromogênio *ortho-Nitrophenyl- β -galactoside* (ONPG). 50 μ L da enzima livre ou imobilizada foram incubados com 180 μ L de ONPG (18 mM) e 270 μ L de tampão fosfato de sódio (0,1 M pH 7,0). Depois de 2 min a reação foi parada pela adição de 1,5 mL do tampão carbonato de sódio (2 M, pH 9,8). O produto liberado foi determinado em espectrofotômetro a 415 nm. Uma unidade de β -galactosidase é definida como a quantidade de enzima que libera 1 μ mol de o-nitrofenol ($\epsilon_m = 4500 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) por minuto nas condições do ensaio. O teor de proteína foi determinado pelo método proposto por Bradford [1976].

2.2 Processos de modificação do colágeno

A funcionalização do colágeno com ácido acético (Collagen-HAc) foi realizada através de uma adaptação do método descrito por Liao et al., [2004]. A partir disso, 1 g de colágeno foi suspenso em 30 mL de uma solução de ácido acético a 25% (v/v) e mantido a 25 °C por 12 h a 150 rpm. Após esse processo foi realizada a separação do material por centrifugação (5000 rpm, 4 °C, 5 min), lavado três vezes com água ultrapura e uma vez com tampão fosfato de sódio (100 mM, pH 7,0 com 4 mM de MgCl_2), para remoção do resíduo de ácido contido no suporte.

O colágeno em pó foi modificado utilizando o agente de ligações cruzadas glutaraldeído (Collagen-Glu) utilizando o método adaptado de Mariotti et al., [2008]. Nesse processo 1 g de colágeno foi suspenso em 30 mL de uma solução de glutaraldeído a 5% (v/v), a mistura foi incubada a 25 °C durante 12 h a 150 rpm. A separação do colágeno foi realizada através da centrifugação (5000 rpm, 4 °C, 5 min) com posteriores lavagens com água ultrapura e tampão fosfato de sódio (100 mM, pH 7,0 com 4 mM de MgCl_2).

A modificação do suporte utilizando alumínio (Collagen-Al) foi realizada através de uma adaptação do método descrito por Lu et al., [2007], onde 1 g de colágeno em pó foi

adicionado em 60 mL de água ultrapura, a mistura permaneceu à temperatura ambiente durante 18 h. O pH da água ultrapura foi pré-ajustado para 1,7-2,0 com ácido acético. Após esse período, foi feita a adição de 2,4 g de $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ e o material foi mantido a 30 °C durante 4 h sob agitação de 150 rpm. Uma quantidade adequada de uma solução saturada de NaHCO_3 foi gradualmente adicionada a fim de aumentar o pH da solução para 7,0. Concluída esta etapa, a mistura foi mantida a 40 °C durante mais 4 h a 150 rpm. Ao final da reação, o colágeno em pó foi separado por centrifugação (5000 rpm, 4 °C, 5 min) e lavado com tampão fosfato de sódio (100 mM, pH 7,0 com 4 mM de MgCl_2).

No método de modificação onde foi realizada a combinação das técnicas com o alumínio e o glutaraldeído (Collagen-Al-Glu), inicialmente o colágeno foi modificado seguindo o método descrito para o Collagen-Al, e após foi realizada a adição de 30 mL de glutaraldeído (5 %, v/v), seguindo a técnica descrita para Collagen-Glu, e agitado por 12 h a 150 rpm. Posteriormente o suporte foi separado e lavado com tampão fosfato de sódio (100 mM, pH 7,0 com 4 mM de MgCl_2).

2.3 Imobilização da β -galactosidase nos suportes modificados

A imobilização foi realizada empregando o suporte colágeno após os quatro tratamentos (Collagen-HAc, Collagen-Glu, Collagen-Al e Collagen-Al-Glu). Os processos foram realizados adicionando 6 mL de uma solução de β -galactosidase (10-200 mg de proteína por grama de suporte) em tampão fosfato de sódio (1 M, pH 7,0 com 4 mM de MgCl_2) em 50 mg de cada suporte. As misturas foram mantidas a 25 °C, a 150 rpm por 24 h. Durante este período, coletas periódicas foram realizadas para acompanhar o rendimento e a eficiência da imobilização pela análise de atividade. A enzima imobilizada foi separada por centrifugação (5000 rpm, 4 °C, 5 min) e os derivados foram lavados duas vezes com tampão fosfato de sódio (100 mM, pH 7,0 com 4 mM de MgCl_2). O rendimento e a eficiência dos processos foram calculados de acordo com Sheldon e Van Pelt [2013]. Após a determinação do rendimento e da eficiência de imobilização, a carga de proteína mais próxima a saturação do suporte em cada tratamento foi selecionada para caracterização. Os resultados dos parâmetros de imobilização foram avaliados através de análise de variância (*Analysis of Variance* - ANOVA) e teste de Tukey para comparação de médias ao nível de 5% de significância, através do programa computacional BioEstat 5.0.

2.4 Caracterização estrutural

As análises termogravimétricas (*Thermogravimetric Analysis* - TGA) dos suportes tratados e dos derivados obtidos foram realizadas empregando o equipamento marca Perkin Elmer, modelo 4000. Variação da temperatura foi de 25 °C até 550 °C com rampa de aquecimento de 5 °C/min, com fluxo de gás nitrogênio 20 mL/min e uma pressão de gás de 3,4 bar.

Os suportes modificados e os derivados foram ainda caracterizados através de espectroscopia de infravermelho (*Infrared Spectroscopy* - IR) utilizando espectrofotômetro marca Shimadzu, modelo Irapidity.

2.5 Propriedades bioquímicas da enzima livre e imobilizada

Os ensaios de pH operacional foram testados na faixa de 5,5 a 8,5 com temperatura fixa em 37 °C. Já a avaliação da temperatura operacional, foi realizada entre 4 e 55 °C no pH 7,0. A atividade máxima da β -galactosidase em cada avaliação foi definida como o controle (100%) para o cálculo da percentagem da atividade residual.

A constante de Michaelis (K_M) e a velocidade máxima de reação (V_{max}) da enzima livre e das imobilizadas foram avaliadas realizando o ensaio de atividade enzimática com diferentes concentrações de ONPG (3-18 mM). Os dados foram determinados utilizando o modelo de Michaelis-Menten, e calculados através da linearização de Lineweaver Burk.

A reutilização da enzima imobilizada na hidrólise da lactose foi determinada usando diferentes substratos lácteos (soro de queijo e leite desnatado) preparados a 5% (m/v) de lactose. As reações foram conduzidas em processos em batelada. Foram realizadas coletas da solução hidrolisada em diferentes intervalos de tempo para determinação do percentual de hidrólise da lactose, o qual avalia a estabilidade operacional da enzima imobilizada. O percentual de hidrólise foi calculado através da análise de glicose utilizando um kit de glicose oxidase Labtest (Minas Gerais, Brasil).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Caracterização estrutural

Os espectros de infravermelho dos suportes modificados e dos derivados são apresentados nas Figuras 1A e 1B. A molécula de colágeno com estrutura de hélice tripla possui bandas de absorção características em torno de 1660, 1550 e 1240 cm^{-1} , que representam as bandas de amônia I, II e III de colágeno, respectivamente [Ku et al., 2007]. Ambas as bandas amida I e II do colágeno podem ser claramente observadas antes (Figura 1A) e após (Figura

1B) a imobilização, o que implica que a estrutura secundária de colágeno foi preservada [Song et al., 2011]. Já a banda de adsorção de amida III em $\sim 1250\text{ cm}^{-1}$ que corresponde aos componentes de vibrações de estiramento C-N e N-H fica sobreposta após a imobilização. Outra alteração no espectro é observada com o aumento da banda entre 3100 e 3700 cm^{-1} , a qual pode ser atribuída à água adsorvida ao suporte [Jitianu et al., 2002].

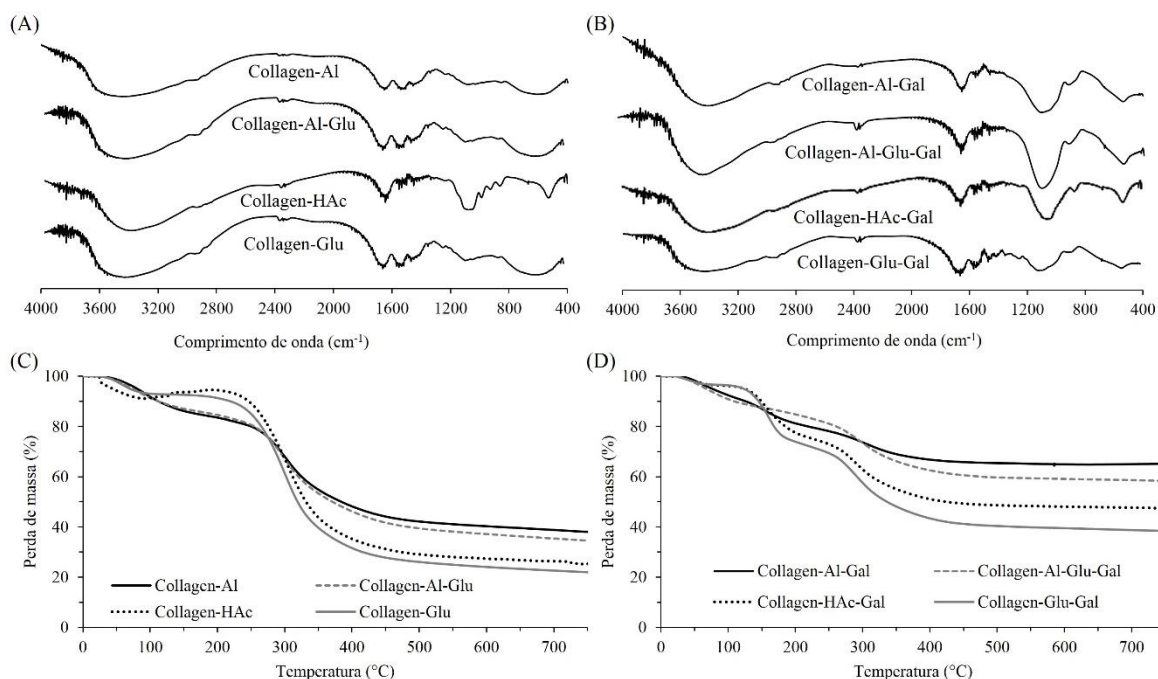


Figura 1. Características estruturais dos suportes modificados (Collagen-Al, Collagen-Al-Glu, Collagen-HAc e Collagen-Glu) e dos derivados (Collagen-Al-Gal, Collagen-Al-Glu-Gal, Collagen-HAc-Gal e Collagen-Glu-Gal) através (A e B) dos espectros de infravermelho e (C e D) das curvas de TGA.

Os termogramas dos suportes modificados (Figura 1C) mostram que a perda de água é de cerca de $\sim 12\%$ entre 100°C e 150°C em todos os tratamentos. Observa-se que a utilização do alumínio na modificação do colágeno proporcionou maior resistência ao aquecimento quando comparado aos demais tratamentos. O segundo estágio de perda de massa ocorreu aproximadamente em 250°C , o que pode ser relacionado à degradação térmica das cadeias poliméricas do colágeno [Mittra et al., 2013]. Após a imobilização (Figura 1D), observa-se nos derivados Collagen-HAc-Gal e Collagen-Glu-Gal um terceiro estágio de perda de massa, provavelmente relacionado à carbonização do material polimérico [Fernandes et al., 2011]. Já em Collagen-Al-Gal e Collagen-Al-Glu-Gal essa perda também ocorre, porém de forma mais

suave. Todos os derivados apresentaram mais de 40% de massa de resíduo após seu aquecimento até 750 °C.

3.2 Propriedades bioquímicas da enzima livre e imobilizada

A enzima β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* foi imobilizada em colágeno submetido a quatro diferentes tratamentos: ácido acético (Collagen-HAc), glutaraldeído (Collagen-Glu), alumínio (Collagen-Al) e uma combinação dos tratamentos com alumínio e glutaraldeído (Collagen-Al-Glu). Os resultados de rendimento e eficiência destes processos estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Resultados dos parâmetros de imobilização da β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* em diferentes preparações de colágeno.

Carga (mg de proteína/g suporte)	Collagen-Al-Gal		Collagen-Al-Glu-Gal		Collagen-HAc-Gal		Collagen-Glu-Gal	
	Rend (%)	Efic (%)	Rend (%)	Efic (%)	Rend (%)	Efic (%)	Rend (%)	Efic (%)
10	70,87 \pm	87,36 \pm	84,53 \pm	72,59 \pm	79,38 \pm	105,85 \pm	82,12 \pm	76,32 \pm
	0,95 ^{A,a}	4,12 ^{AB,a}	2,96 ^{A,a}	3,76 ^{B,a}	3,65 ^{A,a}	4,36 ^{A,a}	2,57 ^{A,a}	2,65 ^{B,a}
20	73,46 \pm	85,29 \pm	83,25 \pm	69,36 \pm	79,45 \pm	99,34 \pm	83,36 \pm	72,85 \pm
	1,39 ^{A,a}	2,85 ^{B,a}	1,85 ^{A,a}	4,64 ^{C,a}	2,68 ^{A,a}	2,54 ^{A,a}	3,91 ^{A,a}	3,76 ^{BC,a}
30	69,57 \pm	90,63 \pm	79,57 \pm	71,83 \pm	75,35 \pm	106,74 \pm	79,65 \pm	76,69 \pm
	2,05 ^{A,a}	1,67 ^{A,a}	3,05 ^{A,a}	2,43 ^{B,a}	2,01 ^{A,a}	1,65 ^{A,a}	2,63 ^{A,a}	4,21 ^{B,a}
100	67,37 \pm	87,12 \pm	74,22 \pm	66,38 \pm	73,44 \pm	98,34 \pm	74,63 \pm	71,95 \pm
	1,32 ^{A,a}	3,75 ^{AB,a}	1,52 ^{A,a}	4,37 ^{C,a}	1,48 ^{A,a}	3,74 ^{A,a}	4,55 ^{A,a}	1,11 ^{BC,a}
200	53,93 \pm	82,65 \pm	54,21 \pm	53,32 \pm	57,18 \pm	109,46 \pm	59,33 \pm	71,54 \pm
	2,06 ^{A,b}	2,54 ^{B,a}	1,57 ^{A,b}	3,54 ^{C,b}	1,15 ^{A,b}	2,50 ^{A,a}	3,44 ^{A,b}	2,77 ^{B,a}

Letras maiúsculas iguais na mesma linha indicam que o parâmetro de imobilização é estatisticamente igual ($p < 0,05$) para os diferentes tratamentos. Letras minúsculas iguais na mesma coluna indicam que o parâmetro de imobilização é estatisticamente igual ($p < 0,05$) para as diferentes cargas proteicas.

Rend = rendimento; Efic = eficiência.

Verifica-se que nos quatro tratamentos do colágeno, conforme a carga de proteína foi aumentada, houve uma redução nos rendimentos de imobilização. Além disso, pode-se observar que em cargas de proteína de até 100 mg de proteína por grama de suporte os rendimentos não apresentaram redução significativa ($p < 0,05$). A eficiência de todos os processos não reduziu apesar do aumento da carga de 10 para 100 mg de proteína. Entretanto, foi observada uma redução quando 200 mg de proteína foram usadas no derivado Collagen-Al-Glu-Gal. Estas diferenças não significativas ($p < 0,05$) nos resultados de eficiência nas cargas de até 100 mg em

cada tratamento indicam que, apesar da superfície do colágeno estar preenchida com as moléculas de enzima, estas não se aglomeram de forma a bloquear os sítios de ligação, uma vez que as enzimas permanecem ativas após a imobilização [Wang et al., 2008].

As eficiências maiores que 100% encontradas no derivado Collagen-HAc-Gal podem ser atribuídas a natureza da imobilização. Uma vez que nesse tratamento o ácido acético foi utilizado para remoção dos resíduos de minerais presentes no suporte, a estrutura do colágeno pode se apresentar mais maleável que nos demais tratamentos, e dessa forma não prejudicar a estrutura tridimensional da enzima [Liao et al., 2004]. O fenômeno da hiper-ativação da enzima após o processo de imobilização também foi verificado por Križnik et al. [2018], que estudaram o processo de imobilização da β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* em nanopartículas magnéticas funcionalizadas com amino-organosilanos e quitosana. Os autores atribuíram o aumento da atividade às mudanças conformacionais na proteína sob a forma de agregados após a imobilização.

Uma vez que não foram observadas reduções significativas ($p < 0,05$) nos parâmetros de imobilização até a carga proteica de 100 mg de proteína, esta foi selecionada para todos os tratamentos e estes derivados foram caracterizados. As propriedades catalíticas da enzima livre e imobilizada foram estudadas em diferentes pHs e temperaturas (Figura 2).

Todos os derivados mostraram o mesmo pH ótimo que a enzima livre, deste modo a máxima atividade foi encontrada em pH 7,0. Entretanto, verificou-se que o tratamento com glutaraldeído em Collagen-Al-Glu-Gal e Collagen-Glu-Gal, resultou em uma redução da sensibilidade da enzima no pH 6,5. A estabilidade da enzima foi reduzida de forma acentuada em meios com pH menores ou igual a 6, enquanto os derivados ainda mantinham em torno de 60% de sua atividade inicial nesta mesma condição. Já em relação à temperatura, o perfil de comportamento da enzima livre praticamente não foi alterado após a imobilização, sendo o valor ótimo de $\sim 37^\circ\text{C}$. Resultados semelhantes foram reportados por Ansari e Husain [2012]. Nesse estudo, a enzima β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* foi imobilizada em Celite 545 utilizando concanavalina como agente de ligações cruzadas. Os autores verificaram que a imobilização não alterou as condições ótimas da enzima, entretanto, da mesma forma que no presente estudo, os derivados apresentaram maior estabilidade em pHs mais ácidos.

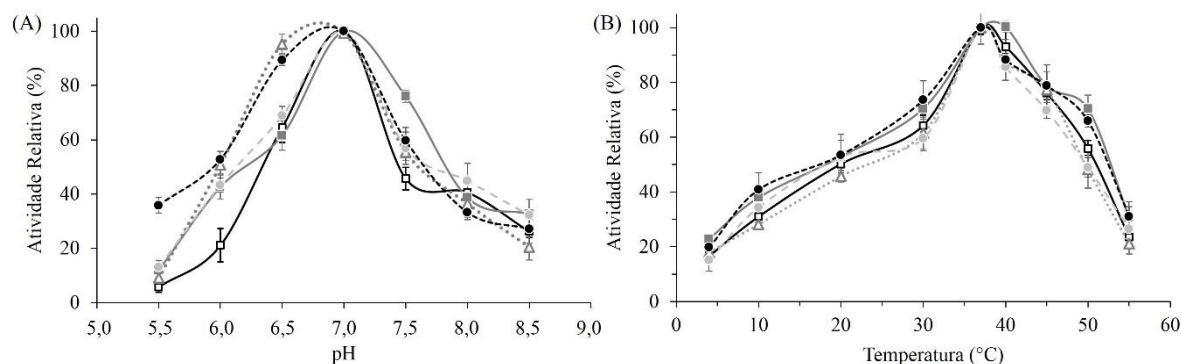


Figura 2. Efeito do pH (A) e da temperatura (B) de reação da β -galactosidase livre e imobilizada. Free Gal (\square), Collagen-Al-Gal (\blacksquare), Collagen-Al-Glu-Gal (\triangle), Collagen-HAc-Gal (\bullet) e Collagen-Glu-Gal (\bullet).

Os parâmetros cinéticos representados pela constante de Michaelis (K_M), velocidade máxima de reação (V_{max}), constante catalítica (k_{cat}) e constante de especificidade catalítica da enzima livre e dos derivados estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Parâmetros cinéticos da β -galactosidase livre e dos quatro derivados produzidos a partir do tratamento do colágeno.

Derivado	K_M (mM)	V_{max} (mM.min ⁻¹)	k_{cat} (min ⁻¹)	Constante de especificidade catalítica (min ⁻¹ mM ⁻¹)
Free Gal	9,83 \pm 1,30	86,13 \pm 6,53	933,78	52,59
Collagen-Al-Gal	25,88 \pm 0,87	71,13 \pm 4,26	734,06	28,36
Collagen-Al-Glu-Gal	18,27 \pm 1,25	47,53 \pm 3,67	581,07	31,81
Collagen-HAc-Gal	23,69 \pm 2,39	55,56 \pm 3,12	466,32	19,69
Collagen-Glu-Gal	22,02 \pm 1,25	66,19 \pm 4,21	737,40	33,49

Os parâmetros cinéticos da enzima livre e imobilizada foram determinados separadamente através da reação com ONPG. Os maiores valores de afinidade enzima/substrato e velocidade máxima de reação foram encontrados para a enzima livre, enquanto que cada tratamento resultou em diferentes comportamentos. O tratamento do colágeno com glutaraldeído em Collagen-Al-Glu-Gal e Collagen-Glu-Gal, parece ter um menor impacto na afinidade da enzima com o substrato. Isso pode ser atribuído às longas cadeias adicionadas após o uso deste agente, que permite que o substrato se aproxime do sítio ativo da enzima sem grandes bloqueios estéricos [Jiang et al., 2000]. Em relação ao derivado Collagen-Al-Gal,

apesar do quelato formado pelo alumínio resultar na maior redução de afinidade, este método de imobilização não apresentou impacto na V_{max} , a qual apresentou os maiores valores entre os derivados. A k_{cat} da Free Gal foi superada por três dos quatro derivados. Entretanto, a maior eficiência na conversão do substrato em produto (avaliada pela constante de especificidade catalítica) foi obtida para a enzima livre.

No estudo de Maugart et al. [2003], a β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* foi imobilizada em Duolite A-568 para aumentar a síntese de galacto-oligossacarídeos. No entanto, os parâmetros cinéticos do derivado apresentaram grande variação. Não só o K_M da enzima imobilizada aumentou mais de 6 vezes (4.1 mM à 26.6 mM), mas também o V_{max} da enzima imobilizada diminuiu 45 vezes (2060 para 45 mmol pNP min⁻¹ ml⁻¹) em comparação com a sua forma solúvel. Esta atividade catalítica reduzida pode ser atribuída a vários fatores, tais como mudanças de conformação proteica induzidas pelo suporte, impedimentos estéricos e efeitos difusórios. Estes fatores podem atuar simultaneamente ou separadamente, alternando o microambiente em torno da enzima imobilizada [Bayramoglu et al., 2007].

A Figura 3 apresenta os resultados da estabilidade operacional da enzima imobilizada na hidrólise da lactose presente em soluções de leite e soro de queijo.

Pode-se observar que com todos os derivados após 17 ciclos de reuso, a enzima manteve seu percentual de hidrólise da lactose em torno de 50%. A perda de atividade, observada pela redução no percentual de hidrólise da lactose, pode ser atribuída à dificuldade da transferência do substrato pelo acúmulo de produto [Valerio et al., 2013]. Além disso, a perda de massa do derivado enzimático durante o procedimento de lavagem em cada ciclo pode ser relacionada a essa redução. Não foi observado diferença na reusabilidade da enzima imobilizada entre os diferentes tratamentos, demonstrando que o protocolo de modificação do suporte não afetou a estabilidade dos derivados.

Estabilidade semelhante à observada na aplicação da enzima foi relatada por Güleç [2013], que imobilizou a enzima β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* em superfícies de membrana polimérica. O autor modificou o suporte (membranas de acetato de celulose) utilizando polimerização por plasma de etilenodiamina e enriquecimento da quantidade de grupos amino através da polietilenoimina. As enzimas imobilizadas em ambos os tratamentos foram sucessivamente reutilizadas na hidrólise da lactose durante cinco ciclos a 25 °C e os derivados enzimáticos retiveram aproximadamente 90% de sua atividade inicial.

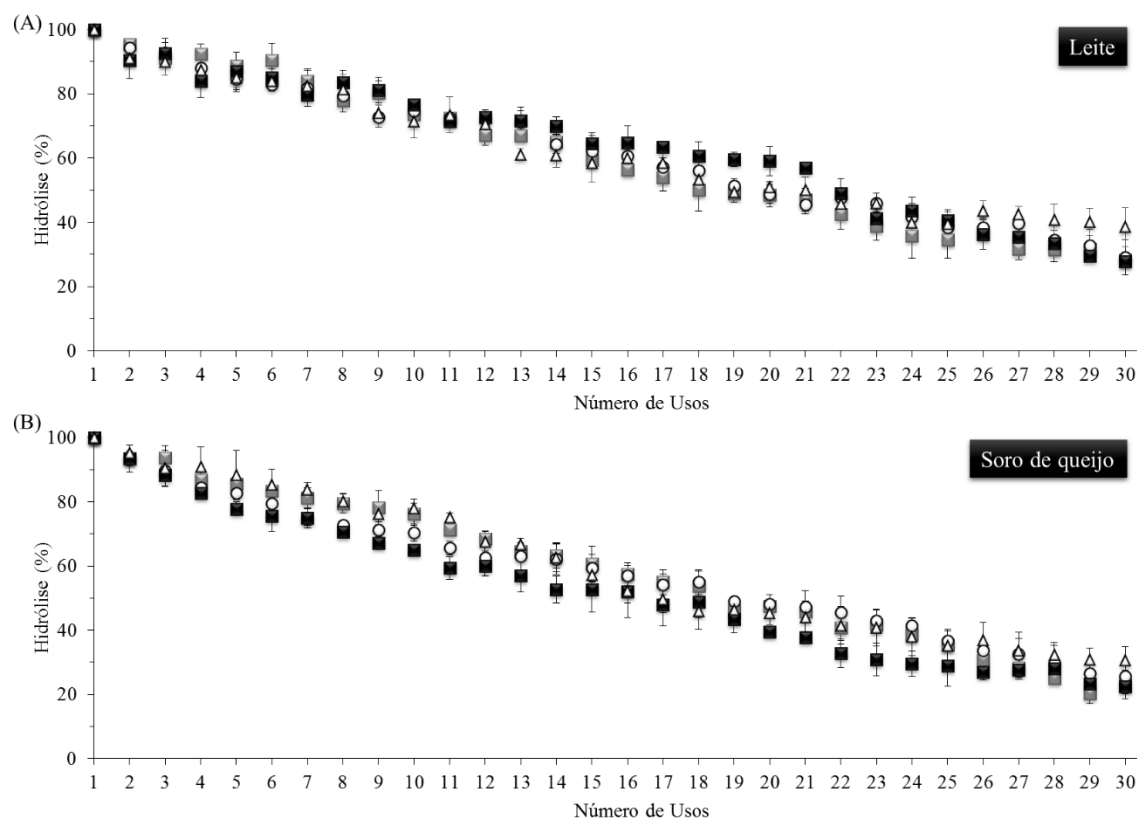


Figura 3. Reusabilidade da enzima β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* em colágeno. A hidrólise da lactose usando as β -galactosidasas imobilizadas foi realizada em uma solução de leite (A) e soro de queijo (B), ambos preparados a 5% de lactose. (■) Collagen-Al-Gal; (○) Collagen-Al-Glu-Gal; (■) Collagen-HAc-Gal; (△) Collagen-Glu-Gal.

4 CONCLUSÃO

Nesse estudo a enzima β -galactosidase comercial de *Kluyveromyces lactis* foi imobilizada em colágeno em pó. Os quatro tratamentos químicos realizados no suporte apresentaram rendimentos e eficiências semelhantes até a carga de 100 mg de proteína/g de suporte. As condições operacionais da enzima livre e imobilizada não apresentaram diferença, sendo que os valores ótimos de pH e temperatura foram de 7,0 e 37 °C, respectivamente. Os derivados apresentaram uma redução na velocidade máxima de reação e na afinidade com o substrato. Entretanto, estes apresentaram alta estabilidade nos ensaios de reusabilidade da enzima, hidrolisando em torno de 50% de lactose após 17 reusos. A partir disso, mostrou-se que o colágeno é um material alternativo com ótimas perspectivas para a imobilização de enzimas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ansari, S. A., & Husain, Q. (2012). Lactose hydrolysis from milk/whey in batch and continuous processes by concanavalin A-Celite 545 immobilized *Aspergillus oryzae* β galactosidase. Food and Bioproducts processing, 90(2), 351-359.
- Bayramoglu, G., Tunali, Y., & Arica, M. Y. (2007). Immobilization of β -galactosidase onto magnetic poly (GMA–MMA) beads for hydrolysis of lactose in bed reactor. Catalysis Communications, 8(7), 1094-1101.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical biochemistry, 72(1-2), 248-254.
- Ellenrieder, G., & Daz, M. (1996). Thermostabilization of naringinase from *Penicillium decumbens* by proteins in solution and immobilization on insoluble proteins. Biocatalysis and Biotransformation, 14(2), 113-123.
- Fernandes, L. L., Resende, C. X., Tavares, D. S., Soares, G. A., Castro, L. O., & Granjeiro, J. M. (2011). Cytocompatibility of chitosan and collagen-chitosan scaffolds for tissue engineering. Polímeros, 21(1), 1-6.
- Gennari, A., Mobayed, F. H., Volpato, G., & de Souza, C. F. V. (2018). Chelation by collagen in the immobilization of *Aspergillus oryzae* β -galactosidase: A potential biocatalyst to hydrolyze lactose by batch processes. International journal of biological macromolecules, 109, 303-310.
- Grosova, Z., Rosenberg, M., & Rebroš, M. (2008). Perspectives and applications of immobilised β -galactosidase in food industry—a review. In Czech Journal of Food Sciences.
- Güleç, H. A. (2013). Immobilization of β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* onto polymeric membrane surfaces: Effect of surface characteristics. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 104, 83-90.
- Jiang, H., Zou, H., Wang, H., Ni, J., Zhang, Q., & Zhang, Y. (2000). On-line characterization of the activity and reaction kinetics of immobilized enzyme by high-performance frontal analysis. Journal of Chromatography A, 903(1), 77-84.
- Jitianu, A., Crisan, M., Meghea, A., Rau, I., & Zaharescu, M. (2002). Influence of the silica based matrix on the formation of iron oxide nanoparticles in the Fe₂O₃–SiO₂ system, obtained by sol–gel method. Journal of Materials Chemistry, 12(5), 1401-1407.

- Jochems, P., Satyawali, Y., Van Roy, S., Doyen, W., Diels, L., & Dejonghe, W. (2011). Characterization and optimization of β -galactosidase immobilization process on a mixed-matrix membrane. *Enzyme and microbial technology*, 49(6), 580-588.
- Krajewska, B. (2004). Application of chitin-and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. *Enzyme and microbial technology*, 35(2), 126-139.
- Križnik, L., Vasić, K., Knez, Ž., & Leitgeb, M. (2018). Hyper-activation of β -galactosidase from *Aspergillus oryzae* via immobilization onto amino-silane and chitosan magnetic maghemite nanoparticles. *Journal of Cleaner Production*.
- Ku, C. S., Sathishkumar, M., & Mun, S. P. (2007). Binding affinity of proanthocyanidin from waste *Pinus radiata* bark onto proline-rich bovine achilles tendon collagen type I. *Chemosphere*, 67(8), 1618-1627.
- Ladero, M., Perez, M. T., Santos, A., & Garcia-Ochoa, F. (2003). Hydrolysis of lactose by free and immobilized β -galactosidase from *Thermus* sp. strain T2. *Biotechnology and bioengineering*, 81(2), 241-252.
- Liao, X., Zhang, M., & Shi, B. (2004). Collagen-fiber-immobilized tannins and their adsorption of Au (III). *Industrial & engineering chemistry research*, 43(9), 2222-2227.
- López-Gallego, F., Montes, T., Fuentes, M., Alonso, N., Grazu, V., Betancor, L., & Fernández-Lafuente, R. (2005). Improved stabilization of chemically aminated enzymes via multipoint covalent attachment on glyoxyl supports. *Journal of Biotechnology*, 116(1), 1-10.
- Lu, A. X., Liao, X. P., Zhou, R. Q., & Shi, B. (2007). Preparation of Fe (III)-immobilized collagen fiber for lysozyme adsorption. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 301(1), 85-93.
- Mariotti, M. P., Yamanaka, H., Araujo, A. R., & Trevisan, H. C. (2008). Hydrolysis of whey lactose by immobilized β -galactosidase. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 51(6), 1233-1240.
- Maugard, T., Gaunt, D., Legoy, M. D., & Besson, T. (2003). Microwave-assisted synthesis of galacto-oligosaccharides from lactose with immobilized β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. *Biotechnology Letters*, 25(8), 623-629.

- Mendes, A. A., Oliveira, P. D., Castro, H. D., & Giordano, R. D. L. C. (2011). Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial. *Química Nova*, 34(5), 831-840.
- Mitra, T., Sailakshmi, G., Gnanamani, A., & Mandal, A. B. (2013). Studies on cross-linking of succinic acid with chitosan/collagen. *Materials Research*, 16(4), 755-765.
- Sheldon, R. A., & van Pelt, S. (2013). Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. *Chemical Society Reviews*, 42(15), 6223-6235.
- Song, N., Chen, S., Huang, X., Liao, X., & Shi, B. (2011). Immobilization of catalase by using Zr (IV)-modified collagen fiber as the supporting matrix. *Process biochemistry*, 46(11), 2187-2193.
- Valerio, S. G., Alves, J. S., Klein, M. P., Rodrigues, R. C., & Hertz, P. F. (2013). High operational stability of invertase from *Saccharomyces cerevisiae* immobilized on chitosan nanoparticles. *Carbohydrate polymers*, 92(1), 462-468.
- Wang, F., Guo, C., Liu, H. Z., & Liu, C. Z. (2008). Immobilization of *Pycnopus sanguineus* laccase by metal affinity adsorption on magnetic chelator particles. *Journal of chemical technology and biotechnology*, 83(1), 97-104.
- Zhang, Z., Zhang, R., Chen, L., & McClements, D. J. (2016). Encapsulation of lactase (β -galactosidase) into κ -carrageenan-based hydrogel beads: Impact of environmental conditions on enzyme activity. *Food chemistry*, 200, 69-75.

4.5 Nanocelulose ligada a nanopartículas magnéticas: suporte promissor para a imobilização de β -galactosidases. Artigo em preparação.

**Nanocelulose ligada a nanopartículas magnéticas: suporte promissor para a
imobilização de β -galactosidases**

Adriano Gennari^a, Francielle Herrmann Mobayed^a, Giandra Volpato^b, Claucia Fernanda Volken de Souza^{a*}

^a Laboratório de Biotecnologia de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade do Vale do Taquari - UNIVATES, Lajeado, RS, Brasil.

^b Curso de Biotecnologia, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul - IFRS, Campus Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brasil.

* Autor correspondente. Laboratório de Biotecnologia de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade do Vale do Taquari - UNIVATES, Av. Avelino Tallini, 171, CEP 95914-014, Lajeado, RS, Brasil. Fone: +55 51 3714 7000. Fax: +55 51 3714 7001. E-mail: claucia@univates.br

Resumo

A celulose é um dos polímeros mais abundantes da terra, podendo ser obtida de diversas fontes. Estruturalmente, apresenta na sua superfície uma série de grupos hidroxila que são capazes de reações químicas com outros materiais. A aplicação industrial desse polissacarídeo na forma de nanocristais ou nanofibras vem ganhando interesse, uma vez que possibilita a melhora de propriedades físicas e mecânicas de outros materiais. A nanocelulose pode ainda ser empregada como suporte para imobilização de enzimas, visando reduzir algumas desvantagens da utilização desses biocatalisadores em indústrias, principalmente em relação à sua estabilidade e reutilização. A enzima β -galactosidase é aplicada na indústria de laticínios no desenvolvimento de produtos com teores reduzidos ou isentos de lactose, entretanto seu alto custo e dificuldade de separação do meio reacional, limitam sua aplicação. Dessa forma, esse trabalho descreve um processo de obtenção de celulose nanocristalina (CN), através de hidrólise ácida ou alcalina da celulose microcristalina, que foi posteriormente ligada à nanopartículas magnéticas e utilizada como suporte para imobilização das β -galactosidas de *Aspergillus oryzae* e *Kluyveromyces lactis*. A hidrólise da celulose foi estudada por via ácida, utilizando HCl, e por via alcalina, com NaOH. As nanopartículas magnéticas foram sintetizadas a partir dos óxidos de Fe^{2+} e Fe^{3+} . O processo de imobilização avaliou, além das diferentes cargas de enzima, o efeito do uso do tripolifosfato no rendimento e na eficiência. Os derivados e a enzima livre foram caracterizados quanto as suas condições ótimas de pH e temperatura, parâmetros cinéticos e reusabilidade na hidrólise da lactose presente no permeado e no soro de queijo utilizando reatores em batelada. Foi possível imobilizar 100 mg de proteína/g de suporte mantendo rendimentos acima de 93% para a β -galactosidase de *A. oryzae* e 78% para a β -galactosidase de *K. lactis*. Os valores de temperatura e pH ótimos para a enzima de *A. oryzae* ficaram entre 4,5 a 4,8 e 58 a 63 °C, respectivamente. Para a enzima de levedura, o pH ótimo foi de 6,5 e a temperatura ficou entre 40 e 43 °C. Em relação aos parâmetros cinéticos, a afinidade, o V_{max} e o k_{cat} dos derivados foram reduzidos após a imobilização. As enzimas imobilizadas puderam ser aplicadas na hidrólise da lactose presente no permeado e soro de queijo por 30 vezes, e ainda atingiram percentuais de hidrólise maiores que 50%. A imobilização das β -galactosidas em nanocelulose magnética apresenta-se como uma alternativa para aplicação industrial, uma vez que seus derivados possuem condições catalíticas amenas e facilidade de separação do meio reacional.

Palavras-chave: *Aspergillus oryzae*, *Kluyveromyces lactis*, hidrólise da lactose.

1 INTRODUÇÃO

A celulose é um biomaterial renovável, que vêm sendo estudado nas mais diversas abordagens práticas. É um dos polímeros mais abundantes da terra, podendo ser obtida de diversas fontes, tais como madeira, algodão e outros materiais à base de plantas [Siró e Plackett, 2010]. A celulose é quimicamente inerte e não apresenta toxidez, o que facilita sua aplicação em conjunto com outros biomateriais. Sua estrutura química possui características hidrofílicas e hidrofóbicas, e esse polissacarídeo ainda apresenta na sua superfície uma série de grupos hidroxila que são capazes de reações químicas com outros materiais [Czaja et al., 2007]. Os derivados de celulose, como a carboximetilcelulose (CMC), o acetato de celulose (AC) e a celulose microcristalina (CM), são de baixo custo, biodegradáveis e biocompatíveis, e portanto, têm despertado o interesse de indústrias químicas e biológicas para diversas aplicações [Zhu et al., 2006].

Com o avanço recente da nanotecnologia, vários tipos de materiais com tamanho nanométrico, tais como nanopartículas metálicas, nanotubos de carbono, nanofibras e nanocelulose, tem sido utilizados para melhorar as propriedades físicas e mecânicas de biopolímeros [Rhim et al., 2013, Adsul et al., 2012]. Diversas técnicas são estudadas para preparação destes materiais, podendo ser através de sínteses, como por exemplo para a produção de nanopartículas magnéticas, ou de hidrólises ácidas ou alcalinas, para a obtenção de nanofibras ou nanocelulose [Reddy e Rhim, 2014, Yu et al., 2014].

A imobilização de enzimas é um processo biotecnológico empregado para reduzir algumas desvantagens da utilização de enzimas em indústrias, principalmente em relação a sua instabilidade em faixas diferentes de suas condições ótimas (pH e temperatura) e a difícil recuperação e reutilização destes biocatalisadores [Gupta et al., 2009; Torres et al., 2013]. No entanto, apesar de diversos métodos de imobilização já terem sido estudados, ainda há uma busca constante por materiais que sejam de baixo custo, inertes, estáveis, acessíveis, resistentes à força mecânica e biocompatíveis sem comprometer a estrutura proteica [Talekar et al., 2013; Sirisha et al., 2016].

A β -galactosidase ou lactase (β -d-glicopiranosil-(1 \rightarrow 4)-d-glicopiranoose) é uma enzima utilizada principalmente na indústria de laticínios, pois catalisa a conversão da lactose nos seus açúcares correspondentes, glicose e galactose [Puri et al., 2010]. As principais β -galactosidasas industriais são derivadas de *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces fragilis*, *Aspergillus niger* e *Aspergillus oryzae* [Zhou e Chen, 2001]. Essa enzima é amplamente aplicada no desenvolvimento de produtos com teores reduzidos ou isentos de lactose, visando seu consumo

por indivíduos incapazes de hidrolisar esse açúcar [Harju et al., 2012]. A lactase tem sido imobilizada em suportes orgânicos e inorgânicos pelas técnicas de adsorção, encapsulamento e ligação covalente [Haider et al., 2009; Neri et al., 2008; Grosova et al., 2008; Bayramoglu et al., 2007]. Entretanto, até a presente data não foram encontrados relatos envolvendo o processo de imobilização da β -galactosidase em nanocelulose ligada a partículas magnéticas.

Nesse trabalho, descrevemos um processo de obtenção de celulose nanocristalina (CN), através de hidrólise ácida ou alcalina, posteriormente ligada à nanopartículas magnéticas, e utilizada como suporte para imobilização das β -galactosidases de *Aspergillus oryzae* e *Kluyveromyces lactis*. A nanocelulose obtida nas duas diferentes hidrólises foi ligada à nanopartículas magnéticas carregadas positiva ou negativamente. Cada uma das β -galactosidases imobilizadas nas duas preparações de nanocelulose-partículas magnéticas foi avaliada quanto as suas condições ótimas de reação, pH e temperatura, e aos seus parâmetros cinéticos. Além disso, sua estabilidade operacional foi avaliada na hidrólise da lactose presente no soro de queijo e no permeado de soro utilizando processos em batelada.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Atividade enzimática das β -galactosidases

A determinação da atividade da enzima β -galactosidase foi realizada utilizando o substrato cromatogênio *ortho*-Nitrophenyl- β -galactoside (ONPG). Para análise da atividade enzimática, uma alíquota de 50 μ L (enzima livre ou imobilizada) foi adicionada a 180 μ L de ONPG (18 mM) e 270 μ L de tampão acetato de sódio 0,1 M pH 4,5 (para as reações com a enzima de *Aspergillus oryzae*) ou fosfato de sódio 0,1 M pH 7,0 (para a enzima de *Kluyveromyces lactis*). A reação foi realizada durante 2 minutos na temperatura ótima de cada enzima (55 °C para *A. oryzae* ou 37 °C para *K. lactis*). O o-nitrofenol (*ortho*-nitrophenol - ONP) liberado foi determinado em espectrofotômetro com um comprimento de onda de 415 nm. Uma unidade de β -galactosidase é definida como a quantidade de enzima que libera 1 μ mol de o-nitrofenol ($\epsilon_m = 4500 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) por minuto nas condições do ensaio. O teor de proteína foi determinado pelo método proposto por BRADFORD [1976].

2.2 Preparação da nanocelulose-nanopartículas magnéticas

Para a hidrólise ácida da celulose, 10 g de celulose microcristalina foram misturadas com 250 mL de uma solução de HCl 6 M e posteriormente aquecida a 90 °C sob agitação contínua. A reação foi mantida por 90 min, e ao final a suspensão foi imersa em banho de gelo

para interromper a reação. A celulose hidrolisada foi separada por centrifugação (5000 rpm, 4 °C, 5 min) e lavada com água ultra pura até a mistura atingir o pH neutro. Ao final, o material foi reconstituído na concentração de 25 mg de celulose por mL de água ultrapura, e armazenado à 4 °C até seu uso futuro.

A hidrólise alcalina da celulose foi realizada adicionando 10 g de celulose microcristalina em 200 mL de solução de NaOH 7% (m/v) e ureia 12% (m/v). A mistura foi agitada por 30 min a 25 °C, e em seguida, mantida a -18 °C por 15 h. Após esta etapa, a mistura foi homogeneizada por 10 min em agitador magnético, e a reação foi parada com a adição de 1000 mL de água ultra pura. O material obtido foi separado por centrifugação (5000 rpm, 4 °C, 5 min) e lavada de 6 a 7 vezes com água ultra pura para remoção da ureia e do NaOH e reduzir o pH para ~7. A nanocelulose foi estocada em solução aquosa na concentração de 25 mg/mL.

As nanopartículas magnéticas (PM) foram sintetizadas utilizando o método de co-precipitação química [Jiang et al., 2012]. Os óxidos de ferro ($\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$; 4,2 g e $\text{FeCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$; 2,16 g) foram dissolvidos em 200 mL de água ultra pura sob atmosfera de nitrogênio e agitação constante. A mistura foi incubada a 85 °C por 5 min e após 40 mL de NH_4OH P.A. foram adicionados. A reação ocorreu por 12 h sob agitação magnética e após as nanopartículas foram coletadas por centrifugação (5000 rpm, 4 °C, 5 min) e lavadas 4 vezes com água ultra pura. As NPM foram secas em estufa a vácuo a 50 °C e -10 mm Hg.

Para a ligação da nanocelulose obtida a partir da hidrólise ácida (H-CN) às nanopartículas magnéticas, 16 mL de H-CN (25 mg/mL) foram misturadas com 100 mg de NPM, 8 mL de HCl 0,1 M e 25 mg de tripolifosfato de sódio (TPP). A mistura foi mantida em banho de ultrassom (25 kHz) por 4 h a 25 °C. Ao final, as H-CN-PM-TPP foram separadas por centrifugação (5000 rpm, 4 °C, 5 min), lavadas e estocadas com água deionizada até o processo de imobilização. O mesmo procedimento de ligação da celulose com as nanopartículas também foi realizado sem a presença do TPP, gerando as H-CN-PM.

A ligação da nanocelulose proveniente da hidrólise alcalina (OH-CN) às nanopartículas magnéticas foi realizada misturando 16 mL de OH-CN (25 mg/mL) com 100 mg de NPM, 8 mL de NaOH 0,1 M e 25 mg de tripolifosfato de sódio (TPP). A mistura foi mantida em banho de ultrassom (25 kHz) por 4 h a 25 °C. Ao final, as OH-CN-PM-TPP foram separadas por centrifugação (5000 rpm, 4 °C, 5 min), lavadas e estocadas com água deionizada até o processo de imobilização. Da mesma forma, a ligação da nanocelulose (OH-CN) com as nanopartículas também foi realizada sem a presença do TPP, gerando as OH-CN-PM.

2.3 Imobilização da β -galactosidase

Os processos de imobilização foram realizados da mesma forma utilizando as H-CN-NP-TPP, H-CN-PM, OH- CN-NP-TPP e OH- CN- PM e ambas as enzimas β -galactosidasas.

A imobilização com a β -galactosidase de *A. oryzae* foi realizada incubando 6 mL de solução enzimática (10-200 mg de proteína por grama de suporte) em tampão acetato de sódio (100 mM pH 4,5) com 100 mg de cada uma das preparações. A mistura foi mantida sob agitação de 150 rpm a 25 °C por 3 h, e alíquotas do sobrenadante foram coletadas em intervalos de tempo para avaliação do rendimento do processo. Ao final, os derivados foram separados por centrifugação (5000 rpm, 4 °C, 5 min), lavados com tampão acetato de sódio (100 mM pH 4,5) para remoção da enzima não ligada, e mantidos no mesmo tampão para posterior avaliação.

Já o processo com a β -galactosidase de *K. lactis* foi realizado incubando 6 mL de solução enzimática (10-200 mg de proteína por grama de suporte) em tampão fosfato de sódio (1 M pH 7,0 com 4 mM de $MgCl_2$) com 100 mg de cada uma das preparações. A mistura foi mantida sob agitação de 150 rpm a 25 °C por 24 h, e alíquotas do sobrenadante foram coletadas em intervalos de tempo para avaliação do rendimento da imobilização. Ao final, os derivados foram separados por centrifugação (5000 rpm, 4 °C, 5 min), lavados com tampão fosfato de sódio (100 mM pH 7,0 com 4 mM de $MgCl_2$) para remoção da enzima não ligada, e mantidos no mesmo tampão para posterior avaliação.

Os processos de imobilização foram avaliados quanto a sua eficiência e rendimento, de acordo com Sheldon e Van Pelt [2013].

2.4 Caracterização dos derivados

As condições ótimas do pH da catálise da enzima livre e das imobilizadas foram investigadas variando o pH de 4,5 a 5,5 com temperatura fixa em 55 °C (para a β -galactosidase de *A. oryzae*) e variando de 6,5 a 7,5 com temperatura fixa em 37 °C (para a enzima de *K. lactis*). Para verificar a temperatura operacional da enzima livre e imobilizada, o pH foi mantido no valor ótimo para cada enzima segundo a literatura (4,5 e 7,0; para *A. oryzae* e *K. lactis*, respectivamente) e a temperatura foi variada de 30 a 65 °C.

Os parâmetros cinéticos da enzima livre e imobilizada foram determinados com base no modelo de Michaelis-Menten, utilizando a linearização de Lineweaver Burk. Nessa etapa o ensaio de atividade enzimática foi realizado com variação na concentração do substrato de 3 a 18 mM de ONPG.

A reusabilidade da enzima imobilizada foi avaliada através de testes de hidrólise em reatores em batelada utilizando soluções de permeado e de soro de queijo, ambas reconstituídas a 5% (m/v) de lactose. O percentual de conversão de lactose foi monitorado com ensaios de quantificação de glicose, através do kit de Glicose (BioLiquid), visando verificar a concentração de glicose no meio após cada ciclo de reutilização.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A celulose microcristalina foi submetida a duas reações de hidrólise, uma em meio ácido (H) e outra em alcalino (OH) (Figura 1). Posteriormente a NC foi ligada à nanopartículas magnéticas (PM). A utilização do tripolifosfato como agente reticulante também foi avaliada em cada processo.

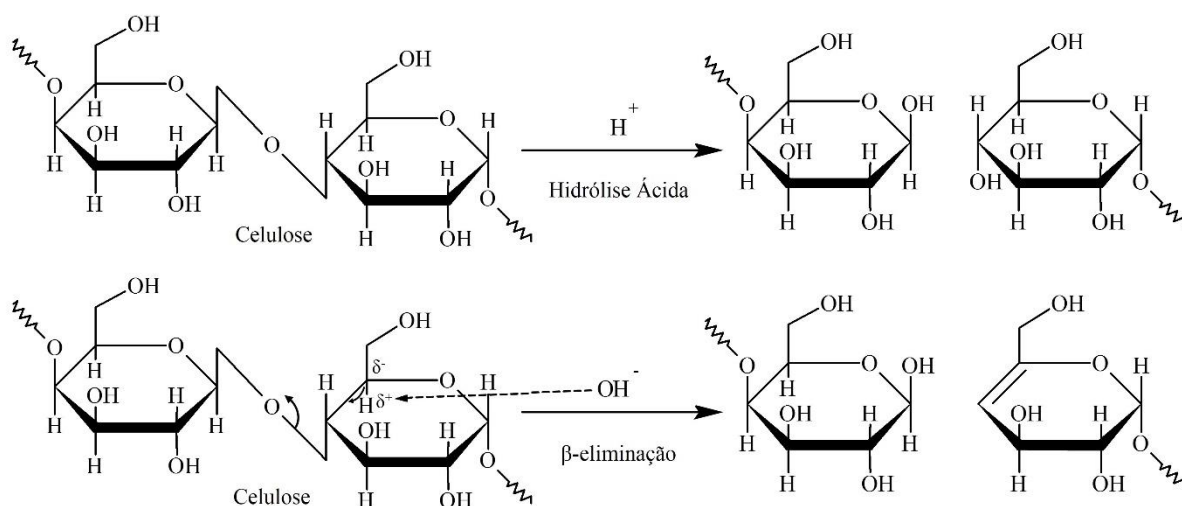


Figura 1. Esquema dos processos de hidrólise da celulose por via ácida e alcalina.

A Figura 2 apresenta a quantidade de proteína imobilizada em cada tratamento a partir das diferentes concentrações oferecidas (10 a 200 mg/g suporte) da β -galactosidase de *A. oryzae*. Foi possível observar que nas concentrações oferecidas de proteína de até 100 mg, praticamente toda a enzima foi imobilizada independentemente do tipo de hidrólise. Nos derivados com a celulose obtida pela hidrólise ácida (Figuras 2A e 2B), a imobilização ocorreu de forma mais rápida, alcançando rendimentos próximos aos seus máximos após aproximadamente 40 min. Já os derivados formados com a celulose hidrolisada com NaOH (Figuras 2C e 2D), levaram em torno de 120 min para alcançarem os mesmos valores. Para a carga oferecida de 200 mg de proteína, apenas 52,53% da enzima foi imobilizada. As eficiências dos derivados com a enzima obtida do fungo filamentosos foram de 96,45; 98,34;

93,55 e 94,77% para os derivados H-CN-PM-Ao, H-CN-PM-TPP-Ao, OH-CN-PM-Ao e OH-CN-PM-TPP-Ao, respectivamente.

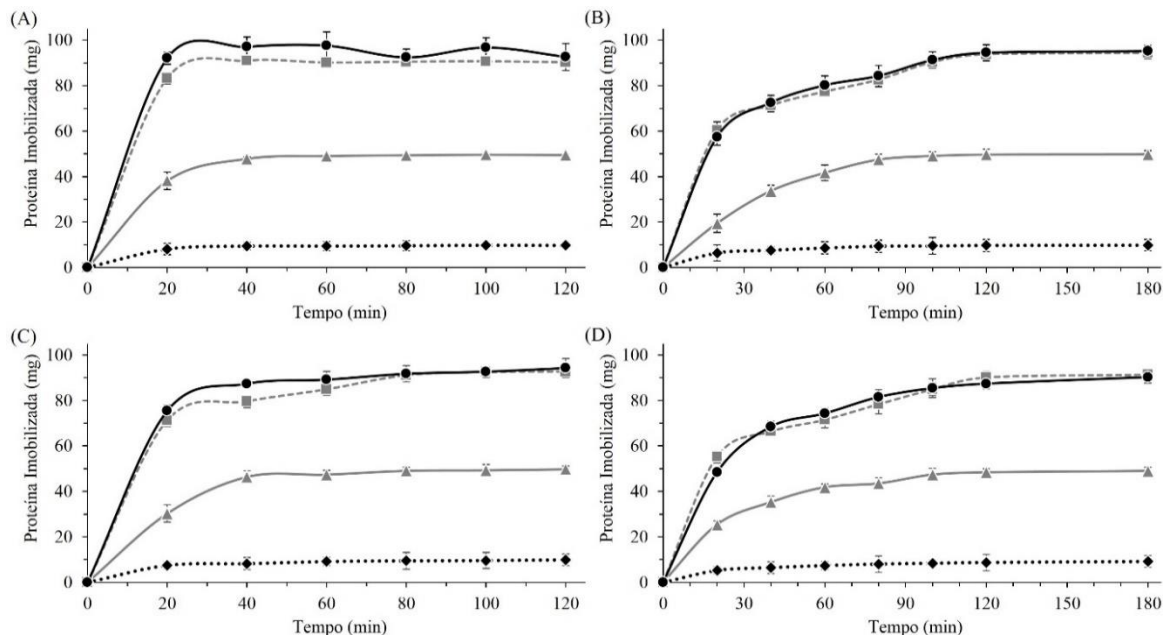


Figura 2. Quantidade de proteína imobilizada com diferentes cargas da β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* em (A) H-CN-PM-Ao, (B) OH-CN-PM-Ao, (C) H-CN-PM-TPP-Ao e (D) OH-CN-PM-TPP-Ao. (◆) 10 mg de proteína, (▲) 50 mg de proteína, (■) 100 mg de proteína e (●) 200 mg de proteína.

As curvas de imobilização com as diferentes cargas de proteína da β -galactosidase de *K. lactis* (Figura 3) foram testadas com concentrações de proteína de 10-200 mg/g suporte. De forma semelhante ao verificado com a enzima de *A. oryzae*, nos derivados com a CN obtida por via ácida a imobilização ocorreu mais rapidamente. Entretanto, os rendimentos máximos só foram alcançados após 24 h de processo. A carga com 200 mg de proteína não foi completamente imobilizada neste período, apresentando rendimentos em torno de 40%. Já utilizando a metade desta quantidade de proteína, os rendimentos dos quatro derivados ficaram entre 78 e 83%, enquanto que as eficiências foram acima de 96%. Além disso, observa-se que o uso do TPP não resultou em diferenças na quantidade de proteína imobilizada para ambas as enzimas avaliadas.

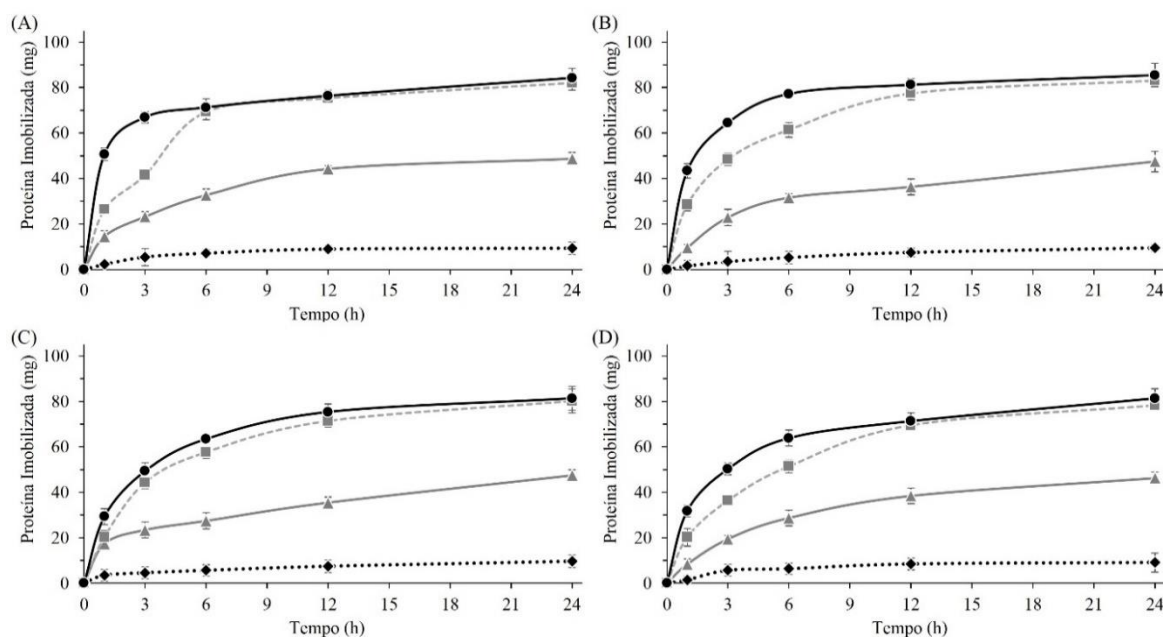


Figura 3. Quantidade de proteína imobilizada com diferentes cargas da β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* em (A) H-CN-PM-KI, (B) OH-CN-PM-KI, (C) H-CN-PM-TPP-KI e (D) OH-CN-PM-TPP-KI. (◆) 10 mg de proteína, (▲) 50 mg de proteína, (■) 100 mg de proteína e (●) 200 mg de proteína.

Os resultados de rendimento e eficiências foram superiores aos relatados por Rahman et al. [2016], que imobilizaram uma nova esterase em celulose ligada à nanopartículas magnéticas. Os autores avaliaram a imobilização utilizando uma carga de 10 mg de proteína, e após 12 h, o rendimento e eficiência obtidos foram de ~60 e ~75%, respectivamente. Provavelmente os processos de hidrólise da nanocelulose avaliados neste estudo foram os responsáveis por possibilitar a imobilização de 10x mais proteína do que o trabalho citado.

Provavelmente a diferença no tempo de imobilização observada para a mesma enzima nos diferentes tratamentos de hidrólise pode estar atribuída à estrutura final da CN em cada processo. A nanocelulose foi obtida através das hidrólises (ácida ou alcalina) das ligações $\alpha(1\rightarrow4)$, ou ainda por reações de β -eliminação. A primeira reação (hidrólise ácida) ocorreu através de despolimerização (diminuição do tamanho da cadeia polimérica), o qual ocorreu devido a temperatura empregada e o uso do meio ácido, levando à hidrólises das ligações $\alpha(1\rightarrow4)$ da celulose [Singthong et al., 2004]. Na β -eliminação (hidrólise alcalina), o hidrogênio mais ácido da molécula de celulose é atacado pelo íon hidróxido, resultando na transferência eletrônica e levando à ruptura da ligação glicosídica e à formação de dupla ligação conjugada [Canteri et al., 2012].

A partir dos resultados obtidos nas curvas de imobilização, somente os derivados que não continham TPP foram submetidos aos testes de caracterização. Para a caracterização das condições catalíticas, a carga de proteína de 100 mg/g de suporte foi a selecionada para a continuação do trabalho.

Em relação às condições ótimas de catálise (Tabela 1), enquanto que a hidrólise ácida não resultou em alteração no pH ótimo da β -galactosidase de *A. oryzae*, sua temperatura operacional passou a ser 5 °C mais elevada. Já quando essa mesma enzima foi imobilizada com a celulose hidrolisada pelo álcali, ambos pH e temperatura ótimos foram alterados. A enzima de *K. lactis* se mostrou menos susceptível a mudanças operacionais, sendo que seu pH ótimo não foi alterado em nenhum dos dois processos, e só em um deles a temperatura foi aumentada. As alterações nas condições ótimas podem ser atribuídas às diversas interações da enzima com a celulose, principalmente através de ligações de hidrogênio [Bayramoglu et al., 2011; Jordan et al., 2011]. Resultados semelhantes foram reportados por Cao et al. [2016], que imobilizaram uma lipase de *Pseudomonas cepacia* em nanocristais magnéticos de celulose. Foi verificada uma pequena alteração nas condições ótimas de pH (6,0 para 6,5) e temperatura (35 para 40 °C) após a imobilização.

Tabela 1. Condições catalíticas ótimas de pH e temperatura, e parâmetros cinéticos das β -galactosidases imobilizadas em celulose.

Derivados	Condições Ótimas		K_M (mM)	V_{max} (mM.min ⁻¹)	k_{cat} (min ⁻¹)
	pH	Temperatura (°C)			
Free Gal-Ao	4,5	58,0	5,82 ± 0,68	50,47 ± 4,78	8,66
H-CN-PM-Ao	4,5	63,0	5,33 ± 0,73	39,31 ± 3,82	7,38
OH-CN-PM-Ao	4,8	60,0	7,55 ± 0,68	31,06 ± 2,83	4,12
Free Gal-Kl	6,5	40,0	9,65 ± 1,22	18,48 ± 2,25	1,92
H-CN-PM-Kl	6,5	40,0	10,97 ± 2,64	17,28 ± 3,82	1,58
OH-CN-PM-Kl	6,5	43,0	13,73 ± 1,26	17,69 ± 0,18	1,29

A constante de Michaelis (K_M) apresentada na Tabela 1 demonstra que a afinidade da enzima pelo substrato praticamente não foi afetada nos derivados com a H-NC, e foi levemente reduzida quanto a enzima imobilizada na OH-CN foi empregada. A velocidade máxima de reação, por sua vez, foi reduzida para os derivados da enzima de *A. oryzae* 22 e 38 % para H-CN-PM-Ao e OH-CN-PM-Ao, respectivamente. Quanto à β -galactosidase de *K. lactis*, tanto os

valores de V_{max} quanto os da k_{cat} permaneceram iguais aos da enzima livre. Estudando um novo processo de imobilização da β -galactosidase de *K. lactis*, Song et al. [2012] montaram um microreator com a enzima imobilizada em nanotubos de carbono utilizando diferentes abordagens. Os autores verificaram que a afinidade da enzima com o substrato e a velocidade máxima de reação não foram alteradas após a imobilização. Esses resultados são similares aos do presente estudo, e demonstram que nos casos estudados não houveram problemas de transferência de massa pelo sistema, provavelmente em função do uso de um suporte nanométrico [Matsuno et al., 2007].

A reusabilidade das enzimas imobilizadas foi avaliada em soluções de permeado de soro e soro de queijo (Figura 3).

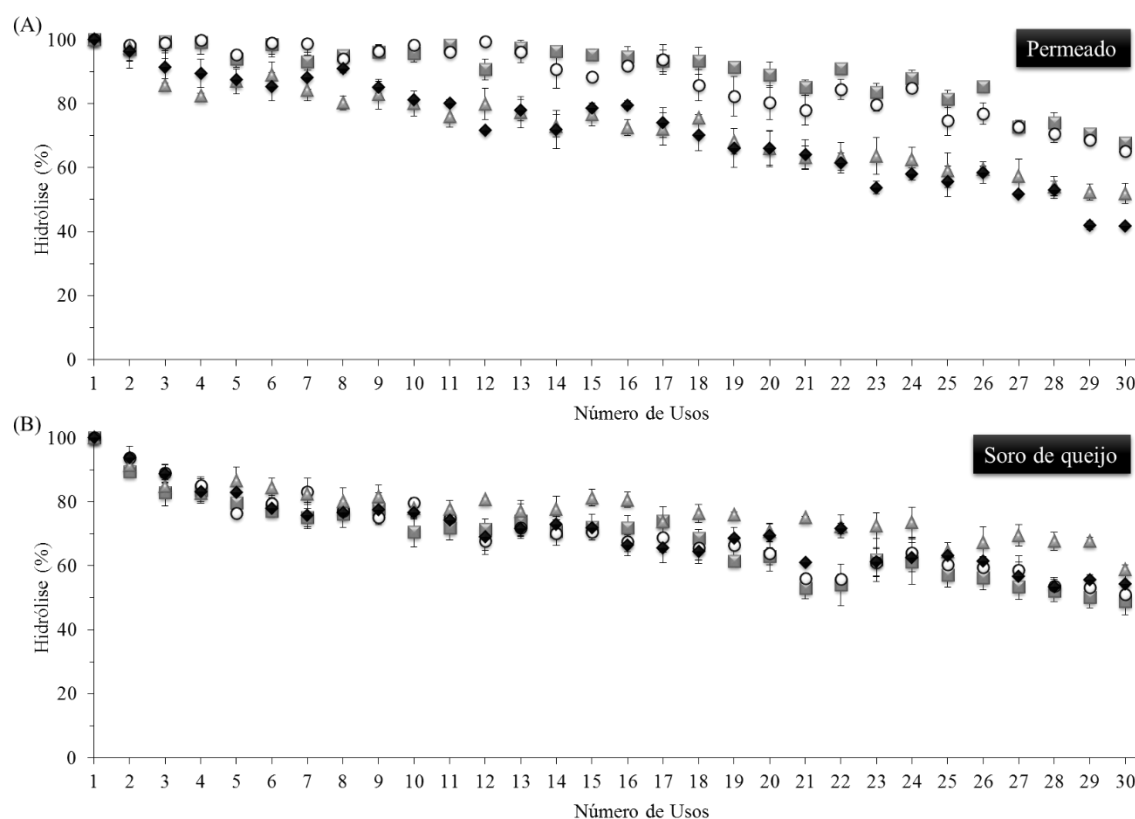


Figura 3. Estabilidade operacional das β -galactosidases de *A. oryzae* e *K. lactis* imobilizadas em nanocelulose. A hidrólise da lactose usando as β -galactosidases imobilizadas foi realizada em permeado (A) e soro de queijo (B), ambos preparados a 5% de lactose. (■) H-CN-PM-Ao; (○) OH-CN-PM-Ao; (▲) H-CN-PM-Kl; (◆) H-CN-PM-Kl.

Observa-se na Figura 3A, que os derivados contendo a β -galactosidase de *A. oryzae* apresentaram maior estabilidade que os da *K. lactis*. Provavelmente isso ocorreu em função do

pH da solução de permeado, que é em torno de 5,7; uma vez que a enzima proveniente do fungo filamentososo tem atividade ótima em pHs mais ácidos enquanto a de levedura tem melhor ação catalítica em valores neutros. Entretanto, quando o soro de queijo foi empregado (pH = 6,2) o inverso não foi observado, o que indica que os derivados H-CN-PM-Ao e OH-CN-PM-Ao apresentaram uma ótima capacidade catalítica fora de sua faixa operacional ótima. Comparando os derivados obtidos com as diferentes hidrólises, não foi observada variação nos seus perfis de reusabilidade. É importante ressaltar que todos os quatro derivados após 30 reusos apresentavam elevada estabilidade, hidrolisando mais de 50% da lactose de qualquer uma das soluções de substrato empregadas. Os valores encontrados estão acima dos reportados por Rahman et al. [2016], que empregando a lipase imobilizada em nanocristais magnéticos de celulose, após oito ciclos de reusos verificaram a perda de aproximadamente 50% da atividade inicial da enzima.

CONCLUSÃO

A imobilização das β -galactosidases de *Aspergillus oryzae* e *Kluyveromyces lactis* em nanocelulose magnética foi reportada neste trabalho. Os dois protocolos de hidrólise da celulose avaliados apresentaram ótimos resultados, imobilizando com sucesso 100 mg de proteína/g de suporte. Os valores de temperatura e pH ótimos para a β -galactosidase de *A. oryzae* ficaram entre 4,5 a 4,8 e 58 a 63 °C, respectivamente. Para a enzima de levedura, o pH ótimo foi de 6,5 enquanto a temperatura ficou entre 40 e 43 °C. Já em relação aos parâmetros cinéticos, o K_M , o V_{max} e o k_{cat} dos derivados foram reduzidos após a imobilização. As enzimas imobilizadas puderam ser aplicadas por mais de 30 vezes na hidrólise da lactose presente no permeado e no soro de queijo, e ainda atingiram percentuais de hidrólise acima de 50%.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adsul, M., Soni, S. K., Bhargava, S. K., & Bansal, V. (2012). Facile approach for the dispersion of regenerated cellulose in aqueous system in the form of nanoparticles. *Biomacromolecules*, 13(9), 2890-2895.
- Bayramoglu, G., Senkal, B. F., Yilmaz, M., & Arica, M. Y. (2011). Immobilization and stabilization of papain on poly (hydroxyethyl methacrylate–ethylenglycol dimethacrylate) beads grafted with epoxy functional polymer chains via surface-initiated-atom transfer radical polymerization (SI-ATRP). *Bioresource technology*, 102(21), 9833-9837.

- Bayramoglu, G., Tunali, Y., & Arica, M. Y. (2007). Immobilization of β -galactosidase onto magnetic poly (GMA–MMA) beads for hydrolysis of lactose in bed reactor. *Catalysis Communications*, 8(7), 1094-1101.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Canteri, M. H., Moreno, L., Wosiacki, G., & Scheer, A. D. P. (2012). Pectin: from raw material to the final product. *Polímeros*, 22(2), 149-157.
- Cao, S. L., Huang, Y. M., Li, X. H., Xu, P., Wu, H., Li, N., ... & Zong, M. H. (2016). Preparation and characterization of immobilized lipase from *Pseudomonas cepacia* onto magnetic cellulose nanocrystals. *Scientific reports*, 6, 20420.
- Czaja, W. K., Young, D. J., Kawecki, M., & Brown, R. M. (2007). The future prospects of microbial cellulose in biomedical applications. *Biomacromolecules*, 8(1), 1-12.
- Grosova, Z., Rosenberg, M., & Rebroš, M. (2008). Perspectives and applications of immobilised β -galactosidase in food industry—a review. In *Czech Journal of Food Sciences*.
- Gupta, P., Dutt, K., Misra, S., Raghuwanshi, S., & Saxena, R. K. (2009). Characterization of cross-linked immobilized lipase from thermophilic mould *Thermomyces lanuginosa* using glutaraldehyde. *Bioresource technology*, 100(18), 4074-4076.
- Haider, T., & Husain, Q. (2009). Hydrolysis of milk/whey lactose by β galactosidase: a comparative study of stirred batch process and packed bed reactor prepared with calcium alginate entrapped enzyme. *Chemical engineering and processing: process intensification*, 48(1), 576-580.
- Harju, M., Kallioinen, H., & Tossavainen, O. (2012). Lactose hydrolysis and other conversions in dairy products: Technological aspects. *International Dairy Journal*, 22(2), 104-109.
- Jiang, H. M., Yan, Z. P., Zhao, Y., Hu, X., & Lian, H. Z. (2012). Zincon-immobilized silica-coated magnetic Fe₃O₄ nanoparticles for solid-phase extraction and determination of trace lead in natural and drinking waters by graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Talanta*, 94, 251-256.
- Jordan, J., Kumar, C. S., & Theegala, C. (2011). Preparation and characterization of cellulase-bound magnetite nanoparticles. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 68(2), 139-146.

- Matsuno, H., Nagasaka, Y., Kurita, K., & Serizawa, T. (2007). Superior activities of enzymes physically immobilized on structurally regular poly (methyl methacrylate) surfaces. *Chemistry of materials*, 19(9), 2174-2179.
- Neri, D. F., Balcão, V. M., Carneiro-da-Cunha, M. G., Carvalho Jr, L. B., & Teixeira, J. A. (2008). Immobilization of β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* onto a polysiloxane–polyvinyl alcohol magnetic (mPOS–PVA) composite for lactose hydrolysis. *Catalysis Communications*, 9(14), 2334-2339.
- Puri, M., Gupta, S., Pahuja, P., Kaur, A., Kanwar, J. R., & Kennedy, J. F. (2010). Cell disruption optimization and covalent immobilization of β -D-galactosidase from *Kluyveromyces marxianus* YW-1 for lactose hydrolysis in milk. *Applied biochemistry and biotechnology*, 160(1), 98-108.
- Rahman, M. A., Culsum, U., Kumar, A., Gao, H., & Hu, N. (2016). Immobilization of a novel cold active esterase onto Fe₃O₄~ cellulose nano-composite enhances catalytic properties. *International journal of biological macromolecules*, 87, 488-497.
- Reddy, J. P., & Rhim, J. W. (2014). Characterization of bionanocomposite films prepared with agar and paper-mulberry pulp nanocellulose. *Carbohydrate Polymers*, 110, 480-488.
- Rhim, J. W., Park, H. M., & Ha, C. S. (2013). Bio-nanocomposites for food packaging applications. *Progress in Polymer Science*, 38(10), 1629-1652.
- Sheldon, R. A., & van Pelt, S. (2013). Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. *Chemical Society Reviews*, 42(15), 6223-6235.
- Singthong, J., Cui, S. W., Ningsanond, S., & Goff, H. D. (2004). Structural characterization, degree of esterification and some gelling properties of Krueo Ma Noy (*Cissampelos pareira*) pectin. *Carbohydrate Polymers*, 58(4), 391-400.
- Sirisha, V. L., Jain, A., & Jain, A. (2016). Enzyme immobilization: an overview on methods, support material, and applications of immobilized enzymes. In *Advances in food and nutrition research* (Vol. 79, pp. 179-211). Academic Press.
- Siró, I., & Plackett, D. (2010). Microfibrillated cellulose and new nanocomposite materials: a review. *Cellulose*, 17(3), 459-494.
- Song, Y. S., Shin, H. Y., Lee, J. Y., Park, C., & Kim, S. W. (2012). β -Galactosidase-immobilised microreactor fabricated using a novel technique for enzyme immobilisation and its application for continuous synthesis of lactulose. *Food chemistry*, 133(3), 611-617.

- Talekar, S., Joshi, A., Joshi, G., Kamat, P., Haripurkar, R., & Kambale, S. (2013). Parameters in preparation and characterization of crosslinked enzyme aggregates (CLEAs). *Rsc Advances*, 3(31), 12485-12511.
- Torres, M. D. P. G., Foresti, M. L., & Ferreira, M. L. (2013). Cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) of selected lipases: a procedure for the proper calculation of their recovered activity. *AMB Express*, 3(1), 25.
- Yu, H., Yan, C., Lei, X., Qin, Z., & Yao, J. (2014). Novel approach to extract thermally stable cellulose nanospheres with high yield. *Materials Letters*, 131, 12-15.
- Zhou, Q. Z., & Chen, X. D. (2001). Effects of temperature and pH on the catalytic activity of the immobilized β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. *Biochemical Engineering Journal*, 9(1), 33-40.
- Zhu, S., Wu, Y., Chen, Q., Yu, Z., Wang, C., Jin, S. & Wu, G. (2006). Dissolution of cellulose with ionic liquids and its application: a mini-review. *Green Chemistry*, 8(4), 325-327.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A utilização de enzimas vem ganhando cada vez mais espaço no ramo industrial devido à crescente demanda por novos produtos e novas tecnologias. Aliada a isso, a imobilização surge como uma ferramenta biotecnológica que intensifica os pontos positivos e reduz as limitações de aplicação destes biocatalisadores. Apesar da recente exploração dessa técnica utilizando diversas enzimas, tais como enoato redutase (LI et al., 2018), β -amilase (DAS et al., 2018), α -glicosidase (LIU et al., 2017), CGTase (SCHÖFFER et al., 2017), β -galactosidase (KRIŽNIK et al., 2018), lacase (JI et al., 2017), lipase (ALAMSYAH et al., 2017), xilanase (MEHNATI-NAJAFABADI et al., 2018), ainda há lacunas para serem preenchidas, e processos a serem desenvolvidos.

Com essa perspectiva, nesse trabalho foram desenvolvidos diversos processos de imobilização com diferentes suportes e com duas diferentes β -galactosidasas microbianas. O primeiro material estudado foi o Immobead 150 (itens 4.1 e 4.3), um suporte comercial com elevada área superficial e excelente estabilidade térmica (MATEO et al., 2007). Além disso, uma proposta de estudo com materiais alternativos de baixo custo também foi explorada, abordando dessa forma o emprego de colágeno (itens 4.2 e 4.4) e celulose (item 4.5). O colágeno, uma proteína insolúvel, abundante, biodegradável e de baixo custo, possui alguns estudos envolvendo sua aplicação na imobilização de enzimas (LU et al., 2007; SONG et al., 2011; CHEN et al., 2011, LIAO et al., 2004, ELLENRIEDER e DAZ, 1996, KATWA et al., 1981). A celulose é um biopolímero natural de fácil obtenção, biodegradável, de baixo custo, e biocompatível com diversas moléculas biológicas. Esse polissacarídeo tem sido empregado principalmente na confecção de filmes e membranas (BAYAZIDI et al., 2018; SALMANI et al., 2018; JE et al., 2017; SULAIMAN et al., 2017). Considerando que a nanotecnologia é uma

área de recente expansão, a utilização de nanocelulose ou outros nanomateriais tem despertado interesse devido às suas características de área superficial e a possibilidade de aplicação em processos contínuos.

5.1 Imobilização em Immobead

Os suportes de epóxi comerciais, como o Eupergit C®, o Sepabeads® e o Immobead 150®, podem ser considerados ideais para imobilização de enzima devido à combinação de suas estruturas físicas e químicas (DALLA-VECCHIA et al., 2004). Os grupos epóxi (oxiranos) podem reagir com diferentes grupos da superfície das proteínas, tais como tióis, grupos amino primários, hidroxila, imidazol e também com ácidos carboxílicos (TURKOVA et al., 1978). O processo descrito no item 4.1 apresenta o primeiro relato de imobilização da β -galactosidase em suporte Immobead. Além deste estudo com a enzima de *Aspergillus oryzae*, o item 4.3 descreve o desenvolvimento do processo de imobilização para a β -galactosidases obtida da levedura *Kluyveromyces lactis*. Os tratamentos químicos do suporte com uma mistura ácida ou com glutaraldeído, além do uso do suporte sem modificação, permitiram uma avaliação direta do efeito do tipo de imobilização nas características catalíticas da enzima. A elevada área superficial e porosidade do Immobead permitiram a imobilização de uma carga proteica de 100 mg de enzima/g de suporte, independente da β -galactosidase empregada. Os melhores parâmetros de imobilização no Immobead 150 utilizando essa mesma carga também foram encontrados por Madalozzo et al. (2015) na imobilização de uma lipase recombinante.

Os parâmetros cinéticos (V_{max} , k_{cat} e constante de especificidade catalítica) e a afinidade da enzima com o substrato de ambas as β -galactosidases imobilizadas pelos diferentes tratamentos foram reduzidos, em comparação com as enzimas livres, provavelmente devido ao efeito de difusão causados pela alta concentração de proteína que foi imobilizada (VALERIO et al., 2013). A alta estabilidade térmica descrita do Immobead refletiram em uma redução na cinética de inativação das enzimas após a imobilização, verificada através dos $t_{1/2}$ e dos parâmetros termodinâmicos. Quando avaliados em relação à reusabilidade na hidrólise da lactose, os derivados tanto com a enzima de *A. oryzae* quanto com a de *K. lactis* apresentaram alta estabilidade operacional. Todos os derivados com o Immobead demonstraram que este é um suporte promissor para a imobilização de β -galactosidases, considerando a possibilidade de aplicação por diversos reusos em diferentes soluções de substrato e as distintas características em seus parâmetros catalíticos.

5.2 Imobilização em colágeno

O colágeno é uma proteína insolúvel, formado por três cadeias polipeptídicas com estruturas helicoidais triplas que se agregam através de ligações de hidrogênio. A estrutura de colágeno tem grupos funcionais abundantes, como OH, COOH, CONH₂ e NH₂, e portanto, permitem com que ele reaja quimicamente com outros compostos (LIAO et al., 2004; KARIM e RAJEEV, 2008). Esta proteína pode ser obtida em diferentes formas, como colágeno bruto, fibra de colágeno, colágeno em pó, colágeno parcialmente hidrolisado (gelatina) e colágeno hidrolisado (GÓMEZ-GUILLÉN et al., 2011). As vantagens aliadas à utilização de um suporte com uma maior área de superfície tornaram o colágeno em pó o suporte foco para os trabalhos descritos nos itens 4.2 (com a enzima de *A. oryzae*) e 4.4 (com a enzima de *K. lactis*).

A imobilização em colágeno foi realizada avaliando quatro tratamentos químicos, utilizando ácido acético, glutaraldeído, alumínio, e alumínio + glutaraldeído. Em relação ao estudo de cargas, cada uma das enzimas utilizadas apresentou um comportamento distinto. Enquanto que na imobilização da enzima de levedura (*K. lactis*) os melhores rendimentos e eficiências do processo foram encontrados para a carga de 100 mg de proteína/g de suporte, a utilização da enzima de fungo filamentosos permitiu um aumento de 10x na quantidade de proteína imobilizada. As imobilizações foram realizadas nos pHs ótimos de cada enzima visando manter sua integridade durante os processos. Provavelmente em pHs mais ácidos a distância entre as cadeias helicoidais do colágeno fica maior, o que permite múltiplas interações com outros compostos. Além disso, em diversos derivados foram obtidas eficiências de imobilização maiores que 100%, um comportamento que é atribuído à abertura do sítio ativo da enzima após a imobilização (DICOSIMO et al., 2013).

Em relação às propriedades das enzimas imobilizadas, os parâmetros cinéticos foram reduzidos após o processo, levemente para a β -galactosidase de *A. oryzae* e um pouco mais pronunciado para a enzima de *K. lactis*. O perfil das condições ótimas (de pH e temperatura) de catálise dos derivados se apresentou semelhante às enzimas livres. Já em relação à aplicação na hidrólise da lactose, o item 4.2 descreve a reusabilidade da enzima em processos em batelada. Nesse trabalho os dois derivados avaliados apresentaram excelente estabilidade, sendo reutilizados mais de 50 vezes nas soluções de substratos cujos pHs apresentavam-se na faixa ácida (ótima da enzima). No trabalho relatado no item 4.4, o processo de aplicação da enzima de *K. lactis* imobilizada também foi avaliada na hidrólise da lactose com reações em batelada. Nesses processos foi possível observar que com todos os derivados após 17 ciclos de reuso, a enzima alcançava percentuais de hidrólise da lactose em torno de 50%, tanto para a solução de

leite, quanto para a solução de soro de queijo. Por fim, esses dois trabalhos avaliaram o potencial de aplicação de um suporte alternativo de baixo custo, que possibilitou a obtenção de derivados com alta estabilidade nas reações de hidrólise em batelada nas diferentes soluções de substrato testadas.

5.3 Imobilização em celulose

A celulose é um dos polímeros mais abundantes da terra e pode ser obtida de diversas fontes, tais como madeira, algodão e outros materiais à base de plantas (SIRÓ e PLACKETT, 2010). Estruturalmente, esse polissacarídeo apresenta uma série de grupos hidroxila que são capazes de reações químicas com outros materiais (ZHU et al., 2006). A nanocelulose é uma das possíveis formas de aplicação da celulose, que vem ganhando mais espaço, uma vez que a nanotecnologia é uma área que têm despertado interesse pelas indústrias (RHIM et al., 2013).

Dessa forma, a nanocelulose também foi avaliada como suporte para imobilização das β -galactosidases (item 4.5). Combinada à nanocelulose foram utilizadas nanopartículas magnéticas para facilitar o processo de separação dos derivados. Nesses processos a imobilização foi testada com cargas de proteína de 10 a 200 mg/g de suporte. Até a carga de 100 mg de proteína/g de suporte os rendimentos de imobilização foram acima de 93% para a β -galactosidase de *A. oryzae* e 78% para a β -galactosidase de *K. lactis*. Em relação às características catalíticas, a enzima de levedura não alterou seus valores ótimos de pH, que permaneceram em 6,5. A temperatura ótima destes derivados e dos da β -galactosidase de *A. oryzae* foi maior ou igual a das enzimas livres. A imobilização em nanocelulose magnética da enzima de *K. lactis* praticamente não alterou os parâmetros cinéticos dos derivados comparados à β -galactosidase livre, sendo que o K_M , V_{max} e k_{cat} foram de aproximadamente 10 mM, 18 mM.min⁻¹ e 1,5 mM.min⁻¹, respectivamente. Para os demais derivados houve uma pequena redução nos três parâmetros após a imobilização. A aplicação das enzimas imobilizadas na hidrólise da lactose foi realizada em processos de batelada. Todos os derivados produzidos apresentaram elevada estabilidade na hidrólise da lactose das soluções de permeado e soro de queijo, atingindo percentuais de hidrólise de ~50% após 30 usos. Os resultados obtidos nestes processos, combinados com a facilidade de separação do suporte pelo uso das partículas magnéticas, tornam a nanocelulose um material promissor para a imobilização enzimática.

5.4 Imobilização da β -galactosidase de *Aspergillus oryzae*

A imobilização da β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* foi realizada nos três suportes em condições semelhantes de pH, temperatura e força iônica. Comparando os processos nos diferentes suportes, o Immobead, por ser um suporte comercial, proporcionou melhores resultados com modificações mais simples. Enquanto que tanto o colágeno quanto a celulose necessitaram de tratamentos mais elaborados para possibilitarem uma adequada imobilização. A velocidade de imobilização em cada suporte apresentou diferença, enquanto os processos em celulose levaram 2-3 h para imobilizar 100 mg de proteína, o Immobead levou aproximadamente 24 h para o mesmo processo. Essa diferença é compreendida ao levar em consideração o tamanho das partículas. O Immobead tem 150 μ m, enquanto a celulose é nanocristalina, o que permitiu muito mais contato com a enzima. O colágeno, por sua vez, levou 48 h, levando em consideração a elevada carga de proteína de 1000 mg/g de suporte (10x mais que nos demais suportes) que foi imobilizada, o que acaba compensando essa diferença no tempo.

O Immobead foi o suporte que mais contribuiu com a estabilidade térmica da enzima, característica que é relacionada a própria natureza sintética do material. O colágeno proporcionou os derivados com maior reusabilidade, que provavelmente foi intensificada pela elevada carga. A celulose apresentou uma maior facilidade para separação, e ainda apresentou elevada estabilidade na hidrólise da lactose. Cada um dos suportes estudados proporcionou derivados com diferentes particularidades.

5.5 Imobilização da β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis*

As imobilizações com a enzima proveniente da levedura *Kluyveromyces lactis* foram processos que demandaram um estudo mais detalhado das condições de imobilização (pH, temperatura, força iônica, tempo, ativadores), uma vez que ela se mostrou menos estável quando armazenada. Essas dificuldades foram reduzidas quando uma força iônica maior do que as que haviam sido utilizadas com a outra enzima (100 mM) foram empregadas (1 M). A sensibilidade nos processos de imobilização foi ainda mais reduzida a partir da mudança do cátion presente no tampão de imobilização. Em relação aos processos de imobilização, a carga de proteína imobilizada em todos os três suportes foi a mesma (100 mg de proteína/g de suporte). Entretanto, comparando estes mesmos processos com a enzima de *A. oryzae*, eles necessitaram um tempo maior para que a imobilização atingisse valores semelhantes. A partir destes processos, verificou-se que os derivados obtidos pelo Immobead, colágeno e celulose

podem ser aplicados na hidrólise da lactose de produtos lácteos com pH próximo da neutralidade sem prejudicar a atividade catalítica da enzima.

6 PERSPECTIVAS FUTURAS

Este trabalho avaliou a utilização de diferentes suportes (Immobead 150, colágeno e celulose) para a imobilização de duas β -galactosidases. Após a realização deste estudo algumas perspectivas futuras podem ser apresentadas.

Uma vez que este trabalho fez uso de enzimas comerciais, é possível iniciar uma proposta avaliando o potencial para produção de β -galactosidases recombinante. Posteriormente será possível avaliar o processo de imobilização destas enzimas.

A aplicação dos derivados em processos de hidrólise utilizando reatores de coluna é mais um trabalho que pode ser realizado.

Outra possibilidade é da busca por novos materiais de baixo custo que possam ser utilizados como suporte para imobilização de enzimas.

Além disso, um estudo realizando uma transição da escala de bancada para uma escala piloto pode ser outra alternativa, visando uma possível aplicação industrial da β -galactosidase imobilizada.

Por fim, todo este estudo e os acima citados podem ser bioeconomicamente avaliados, para conhecimento do potencial biotecnológico destes processos a nível comercial.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIRES-BARROS, M. R. Biocatálise em solventes orgânicos. Centro de Engenharia Biológica e Química Instituto Superior Técnico. **Biocatálise**, 2002.

ALAGÖZ, D.; ÇELİK, A.; YILDIRIM, D.; TÜKEL, S. S.; BINAY, B. Covalent immobilization of *Candida methyllica* formate dehydrogenase on short spacer arm aldehyde group containing supports. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 130, p. 40-47, 2016.

ALAMSYAH, G.; ALBELS, V. A.; SAHLAN, M.; HERMANSYAH, H. Effect of chitosan's amino group in adsorption-crosslinking immobilization of lipase enzyme on resin to catalyze biodiesel synthesis. **Energy Procedia**, v. 136, p. 47-52, 2017.

ALBUQUERQUE, T. L.; PEIRCE, S.; RUEDA, N.; MARZOCHELLA, A.; GONÇALVES, L. R.; ROCHA, M. V. P.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Ion exchange of β -galactosidase: The effect of the immobilization pH on enzyme stability. **Process Biochemistry**, v. 51, p. 875-880, 2016.

ALMEIDA, A. C. S.; COSTA DE ARAÚJO, L.; MENDES COSTA, A.; MORAES DE ABREU, C. A.; GOMES DE ANDRADE LIMA, M. A.; PALHA, P. F.; DE LOS ANGELES, M. Sucrose hydrolysis catalyzed by auto-immobilized invertase into intact cells of *Cladosporium cladosporioides*. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 8, p. 54-62, 2005.

AMARA, C. B.; EGHBAL, N.; DEGRAEVE, P.; GHARSALLAOUI, A. Using complex coacervation for lysozyme encapsulation by spray-drying. **Journal of Food Engineering**, v. 183, p. 50-57, 2016.

- ANSARI, S. A.; HUSAIN, Q. Lactose hydrolysis from milk/whey in batch and continuous processes by concanavalin A-Celite 545 immobilized *Aspergillus oryzae* β -galactosidase. **Food and Bioproducts processing**, v. 90, p. 351-359, 2012.
- BAYAZIDI, P.; ALMASI, H.; ASL, A. K. Immobilization of lysozyme on bacterial cellulose nanofibers: Characteristics, antimicrobial activity and morphological properties. **International journal of biological macromolecule**, 2017
- BOLIVAR, J. M.; MATEO, C.; ROCHA-MARTIN, J.; CAVA, F.; BERENGUER, J.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; GUISÁN, J. M. The adsorption of multimeric enzymes on very lowly activated supports involves more enzyme subunits: Stabilization of a glutamate dehydrogenase from *Thermus thermophilus* by immobilization on heterofunctional. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 44, p. 139-144, 2009.
- BORASTON, A. B.; MCLEAN, B. W.; KAVOOSI, M.; HAYNES, C. A.; KILBURN, D. G. Cellulose-binding fusion proteins. **Methods and Tools in Biosciences and Medicine**, p. 148-162, 2002.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº. 205. Enzimas e Preparações Enzimáticas para Uso na Produção de Alimentos Destinados ao Consumo Humano. **Diário Oficial da União**, Brasília, 14 nov. 2006.
- CABRAL J. M. S. Basic Biotechnology. 2nd Edition. **Cambridge University Press**, 2001.
- CANDANEDO, S.; ROMAN, M.; GRAY, G. Effect of reaction conditions on the properties and behavior of wood cellulose nanocrystal suspensions. **Biomacromolecule**, v. 6, p. 1048, 2005.
- CAO, L. Carrier-bound Immobilized Enzymes. Principles, Applications and Design. **The Netherlands: Wiley-VHC**, 2005.
- CAREVIĆ M.; ČOROVIĆ, M.; MIHAILOVĆ, M.; BANJANAC, K.; MILISAVLJEVIĆ, A.; VELIČKOVIĆ, D.; BEZBRADICA, D. Galacto-oligosaccharide synthesis using chemically modified β -galactosidase from *Aspergillus oryzae* immobilised onto macroporous amino resin. **International Dairy Journal**, v. 54, p. 50-57, 2016.
- CHEN, S.; SONG, N.; LIAO, X.; SHI, B. Immobilization of catalase on Fe (III) modified collagen fiber. **Chinese Journal of Biotechnology**, v. 27, p. 1076-1081, 2011.
- DALLA-VECCHIA, R.; DA GRAÇA NASCIMENTO, M.; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Química Nova**, v. 27, p. 623-630, 2004.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de alimentos de Fennema**, Artmed, 2010.

DAS, R.; TALAT, M.; SRIVASTAVA, O. N.; KAYASTHA, A. M. Covalent immobilization of peanut β -amylase for producing industrial nano-biocatalysts: A comparative study of kinetics, stability and reusability of the immobilized enzyme. **Food chemistry**, v. 245, p. 488-499, 2018.

DENG, X.; FANG, Z.; LIU, Y. Ultrasonic transesterification of *Jatropha curcas* L. oil to biodiesel by a two-step process. **Energy Convers Manag**, v. 5, p. 2802-2807, 2010.

DICOSIMO, R.; MCAULIFFE, J.; POULOSE, A. J.; BOHLMANN, G. Industrial use of immobilized enzymes. **Chemical Society Reviews**, v. 42, p. 6437-6474, 2013.

DSM FOOD SPECIALITIES. Maxilact ® A lactase de levedura láctea - aplicações em leite e soro. **The Netherlands**, 2009.

ELLENRIEDER, G.; DAZ, M. Thermostabilization of naringinase from *Penicillium decumbens* by proteins in solution and immobilization on insoluble proteins. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 14, p. 113-123, 1996.

ESLAMIPOUR, F.; HEJAZI, P. Effects of surface modification and activation of magnetic nanoparticles on the formation of amylase immobilization bonds under different ionic strength conditions. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 119, p. 1-11, 2015.

ESTEVINHO, B. N.; RAMOS, I.; ROCHA, F. Effect of the pH in the formation of β -galactosidase microparticles produced by a spray-drying process. **International journal of biological macromolecules**, v. 78, p. 238-242, 2015.

EVANS, N. A.; MILLIGAN, B.; MONTGOMERY, K. C. Collagen crosslinking: new binding sites for mineral tannage. **American Leather Chemists Association**, v. 82, p. 86-95, 1987.

FREITAS, F. F. Otimização do Processo de Imobilização de β -Galactosidase de *Aspergillus oryzae* em Alginato de sódio com gelatina e glutaraldeído. **Tese de Doutorado**. Faculdade de Engenharia Química - UFU, 2007.

FREITAS, F. F.; MARQUEZ, L. D. S.; RIBEIRO, G. P.; BRANDÃO, G. C.; CARDOSO, V. L.; RIBEIRO, E. J. A comparison of the kinetic properties of free and immobilized *Aspergillus oryzae* β -galactosidase. **Biochemical Engineering Journal**, v. 58-59, p. 33-38, 2011.

GARCIA, P. R. A. F.; BICEV, R. N.; OLIVEIRA, C. L. P.; SANT'ANNA, O. A.; FANTINI, M. C. A. Protein encapsulation in SBA-15 with expanded pores. **Microporous and Mesoporous Materials**, in press, 2016.

GARCIA-GALAN, C.; BARBOSA, O.; HERNANDEZ, K.; SANTOS, J.; RODRIGUES, R.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Evaluation of Styrene-Divinylbenzene Beads as a Support to Immobilize Lipases. **Molecules**, v. 19, n. 6, p. 7629-7645, 2014.

GEKAS, V.; LOPEZ-LEIVA, M. L. Hydrolysis of lactose: a literature review. **Process Biochem**, v. 20, n. 2, p. 2-12, 1985.

GÓMEZ-GUILLÉN, M. C.; GIMÉNEZ, B.; LÓPEZ-CABALLERO, M. E.; MONTERO, M. P. Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review. **Food Hydrocolloids**, v. 25, p. 1813-1827, 2011.

GROSOVÁ, Z.; ROSENBERG, M.; REBROS, M. Perspectives and applications of immobilised β -galactosidase in food industry - a review. **Czech Journal of Food Science**, v. 26, n. 1, p. 1-14, 2008.

GUIDINI, C. Z.; FISCHER, J.; SANTANA, L. N. S.; CARDOSO, V. L.; RIBEIRO, E. J. Immobilization of *Aspergillus oryzae* β -galactosidase in ion exchange resins by combined ionic-binding method and cross-linking. **Biochemical Engineering Journal**, v. 52, p. 137-143, 2010.

GUISAN, J. M. Aldehyde-agarose gels as activated supports for immobilization-stabilization of enzymes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 10, n. 6, p. 375-382, 1988.

GUISAN, J. M. Immobilization of enzymes as the 21st century begins. In: Guisan, J. M, editor. *Methods in biotechnology: immobilization of enzymes and cells*. 2 ed. Totowa, NJ: **Humana Press Inc**, p. 1-13, 2006.

HAIDER, T.; HUSAIN, Q. Hydrolysis of milk/whey lactose by β -galactosidase: A comparative study of stirred batch process and packed bed reactor prepared with calcium alginate entrapped enzyme. **Chemical engineering and processing: process intensification**, v. 48, p. 576-580, 2009.

HASAN, F.; ALI SHAH, A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, p. 126-139, 2004.

HASHEM, A. M.; GAMAL, A. A.; HASSAN, M. E.; HASSANEIN, N. M.; ESAWY, M. A. Covalent immobilization of *Enterococcus faecalis* Esawy dextransucrase and dextran synthesis. **International journal of biological macromolecules**, v. 82, p. 905-912, 2016.

HATZINILOLAOU, D. G.; KATSIFAS, E.; MAMMA, D.; KARAGOUNI, A. D.; CHRISTAKOPOULOS, P.; KEKOS, D. Modeling of the simultaneous hydrolysis-ultrafiltration of whey permeate by a thermostable β -galactosidase from *Aspergillus niger*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 24, p. 161-172, 2005.

HENRIKSSON, M.; HENRIKSSON, G.; BERGLUND, L.; LINDSTROM, T. An environmentally friendly method for enzyme-assisted preparation of microfibrillated cellulose (MFC) nanofibers. **European Polymer Journal**, v. 43, p. 3434, 2007.

HUANG, X. J.; CHEN, P. C.; HUANG, F.; CHEN, M. R.; XU, Z. K. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on electrospun cellulose nanofiber membrane. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 70, p. 95-100, 2011.

ITABAIANA, J. R I.; DEMARIZ-EMIRANDA, L. S.; SOUZA, R. Towards a continuous flow environment for lipase-catalyzed reactions. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, p. 85-86, 2013.

JE, H. H.; NOH, S.; HONG, S. G.; JU, Y.; KIM, J.; HWANG, D. S. Cellulose nanofibers for magnetically-separable and highly loaded enzyme immobilization. **Chemical Engineering Journal**, v. 323, p. 425-433, 2017.

JESIONOWSKI, T.; ZDARTA, J.; KRAJEWSKA, B. Enzyme immobilization by adsorption: a review. **Adsorption**, p. 1-21, 2014.

JI, C.; NGUYEN, L. N.; HOU, J.; HAI, F. I.; CHEN, V. Direct immobilization of laccase on titania nanoparticles from crude enzyme extracts of *P. ostreatus* culture for micro-pollutant degradation. **Separation and Purification Technology**, v. 178, p. 215-223, 2017.

JOCHEMS, P.; SATYAWALI, Y.; VAN ROY, S.; DOYEN, W.; DIELS, L.; DEJONGHE, W. Characterization and optimization of β -galactosidase immobilization process on a mixed-matrix membrane. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 49, p. 580-588, 2011.

JURADO E.; CAMACHO F.; LUZÓN G.; VICARIA J. M. A new kinetic model proposed for enzymatic hydrolysis of lactose by a β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, p. 300-309, 2002.

- JURADO, E.; CAMACHO, F.; LUZÓN, G.; VICARIA, J. M. Kinetic model of activity for proposed for β -galactosidases: influence of pH, ionic concentration and temperature. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 34, p. 33-40, 2004.
- KARIM, A. A.; RAJEEV, B. H. A. T. Gelatin alternatives for the food industry: recent developments, challenges and prospects. **Trends in food science & technology**, v. 12, p. 644-656, 2008.
- KLEIN, M. P.; HACKENHAAR, C. R.; LORENZONI, A. S.; RODRIGUES, R. C.; COSTA, T. M.; NINOW, J. L.; HERTZ, P. F. Chitosan crosslinked with genipin as support matrix for application in food process: Support characterization and β -d-galactosidase immobilization. **Carbohydrate polymers**, v. 137, p. 184-190, 2016.
- KLEIN, M. P.; Imobilização de β -Galactosidase para obtenção de Produtos Lácteos com baixo teor de lactose. **Dissertação de Mestrado**, Programa de pós-graduação em ciência e tecnologia de alimentos - UFRS, 2010.
- KLEMM, D.; KRAMER, F.; MORITZ, S.; LINDSTRO, M. T.; ANKERFORS, M.; GRAY, D.; DORRIS, A. Nanocelluloses: a new family of naturebased materials. **Angewandte Chemie**, v. 50, p. 5438-5466, 2011.
- KOTEL'NIKOVA, N. E.; MIKHAILOVA, S. A.; VLASOVA, E. N. Immobilization of proteolytic enzymes trypsin and α -chymotrypsin to cellulose matrix. **Russian Journal of Applied Chemistry**, v. 80, p. 322-329, 2007.
- KOURKOUTAS, Y.; BEKATOROU, A.; BANAT, I. M.; MARCHANT, R.; KOUTINAS, A. A. Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: a review. **Food Microbiology**, v. 21, p. 377-397, 2004.
- KRAJEWSKA, B. Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, p. 126-139, 2004.
- KRIŽNIK, L.; VASIĆ, K.; KNEZ, Ž.; LEITGEB, M. Hyper-activation of β -galactosidase from *Aspergillus oryzae* via immobilization onto amino-silane and chitosan magnetic maghemite nanoparticles. **Journal of Cleaner Production**, 2018.
- KRZEK, M.; VAN BEEK, H. L.; PERMENTIER, H. P.; BISCHOFF, R.; FRAAIJE, M. W. Covalent immobilization of a flavoprotein monooxygenase via its flavin cofactor. **Enzyme and microbial technology**, v. 82, p. 138-143, 2016.

- KUMAR, D.; NAGAR, S.; BHUSHAN, I.; KUMAR, L.; PARSHAD, R.; GUPTA, V.K. Covalent immobilization of organic solvent tolerant lipase on aluminum oxide pellets and its potential application in esterification reaction. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 87, p. 51-61, 2013.
- LADERO, M.; PEREZ, M. T.; SANTOS, A.; GARCIA-OCHOA, F. Hydrolysis of lactose by free and immobilized β -Galactosidase from *Thermus* sp. Strain T2. **Wiley Periodicals**, v. 81, p. 241-252, 2003.
- LALONDE, J.; MARGOLIN, A. Immobilization of enzymes. In: Drauz, K.; Waldmann, H. **Enzyme catalysis in organic chemistry**, 2nd ed. Wiley-VCH, Weinheim, p. 163-184, 2002.
- LE, T. T.; MURUGESAN, K.; LEE, C. S.; VU, C. H.; CHANG, Y. S.; JEON, J. R. Degradation of synthetic pollutants in real wastewater using laccase encapsulated in core-shell magnetic copper alginate beads. **Bioresource technology**, v. 216, p. 203-210, 2016.
- LI, H.; XIAO, W.; XIE, P.; ZHENG, L. Co-immobilization of enoate reductase with a cofactor-recycling partner enzyme. **Enzyme and microbial technology**, v. 109, p. 66-73, 2018.
- LIAO, X.; ZHANG, M.; SHI, B. Collagen-fiber-immobilized tannins and their adsorption of Au (III). **Industrial & engineering chemistry research**, v. 43, p. 2222-2227, 2004.
- LIU, D. M.; CHEN, J.; SHI, Y. P. α -Glucosidase immobilization on chitosan-enriched magnetic composites for enzyme inhibitors screening. **International journal of biological macromolecules**, v. 105, p. 308-316, 2017.
- LIU, K.; LI, X. F.; LI, X. M.; HE, B. H.; ZHAO, G. L. Lowering the cationic demand caused by PGA in papermaking by solute adsorption and immobilized pectinase on chitosan beads. **Carbohydrate Polymers**, v. 82, p. 648-652, 2010.
- LIU, Y.; CHEN, J. Y. Enzyme immobilization on cellulose matrixes. **Journal of Bioactive and Compatible Polymers**, v. 31, p. 553-567, 2016.
- LÓPEZ-GALLEGU, F.; MONTES, T.; FUENTES, M.; ALONSO, N.; GRAZU, V.; BETANCOR, L.; GUISÁN, J. M.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Improved stabilization of chemically aminated enzymes via multipoint covalent attachment on glyoxyl supports. **Journal of Biotechnology**, v. 116, n. 1, p. 1-10, 2005.

LU, A. X.; LIAO, X. P.; ZHOU, R. Q.; SHI, B. Preparation of Fe(III)-immobilized collagen fiber for lysozyme adsorption. **Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects**, v. 301, p. 85-93, 2007.

MADALOZZO, A. D.; MARTINI, V. P.; KUNIYOSHI, K. K.; DE SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O.; GLOGAUER, A.; ZANIN G. M.; MITCHELL D. A.; Krieger, N. Immobilization of LipC12, a new lipase obtained by metagenomics, and its application in the synthesis of biodiesel esters. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 116, p. 45-51, 2015.

MANERA, A. P. Otimização do meio de cultura para produção da enzima β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 e caracterização parcial da enzima. **Rio Grande**, v. 76, 2006.

MARQUEZ, L. D. S. Produção de açúcar invertido pelo uso de invertase imobilizada em resinas. **Dissertação de Mestrado**, UFU, 2007.

MARQUEZ, L. D. S.; RIBEIRO, E. J.; ARAÚJO, E. H. Estudos de Meios de cultura na síntese de β -Galactosidase por fermentação com *Kluyromyces marxianus*. **SINAFERM**, 2003.

MARTINS, A. R.; BURKERT, C. A. V. Galacto-oligossacarídeos (GOS) e seus efeitos prebióticos e bifidogênicos. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 12, n. 3, p. 230-240, 2009.

MATEO, C.; PALOMO, J. M.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUISAN, J. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 1451-1463, 2007.

MATTAR, R.; MAZO, D. F. C.; Intolerância à lactose: mudança de paradigmas com a biologia molecular. **Revista Associação Médica Brasileira**, v. 56, p. 230-236, 2010.

MATTE, C. R.; BORDINHÃO, C.; POPPE, J. K.; RODRIGUES, R. C.; HERTZ, P. F.; AYUB, M. A. Synthesis of butyl butyrate in batch and continuous enzymatic reactors using *Thermomyces lanuginosus* lipase immobilized in Immobead 150. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 127, p. 67-75, 2016.

MEHNATI-NAJAFABADI, V.; TAHERI-KAFRANI, A.; BORDBAR, A. K. Xylanase immobilization on modified superparamagnetic graphene oxide nanocomposite: Effect of

- PEGylation on activity and stability. **International journal of biological macromolecules**, v. 107, p. 418-425, 2018.
- MENDES, A. A.; OLIVEIRA, P. C.; CASTRO, F. C.; GIORDANO, R. L. C. Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial. **Química Nova**, v. 34, n. 5, p. 831-840, 2011.
- MISHRA, A.; SHARMA, A. K.; SHARMA, S.; BAGAI, R.; MATHUR, A. S.; GUPTA, R. P.; TULI, D. K. Lignocellulosic ethanol production employing immobilized *Saccharomyces cerevisiae* in packed bed reactor. **Renewable Energy**, in press, 2016.
- MORENO-CORTEZ, I. E.; ROMERO-GARCÍA, J.; GONZÁLEZ-GONZÁLEZ, V.; GARCÍA-GUTIERREZ, D. I.; GARZA-NAVARRO, M. A.; CRUZ-SILVA, R. Encapsulation and immobilization of papain in electrospun nanofibrous membranes of PVA cross-linked with glutaraldehyde vapor. **Materials Science and Engineering: C**, v. 52, p. 306-314, 2015.
- NEKLYUDOV, A. D. Nutritive fibers of animal origin: collagen and its fractions as essential components of new and useful food products. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 39, n. 3, 2003.
- OLIVEIRA, E. A. Imobilização da enzima frutossiltransferase extracelular de *Rhodotorula* e aplicação na produção de frutooligosacarídeos. Dissertação de Mestrado. **Mestrado em Engenharia de Alimentos**, Campinas, 2007.
- OSMAN, B.; KARA, A.; UZUN, L.; BESIRLI, N.; DENIZLI, A. Vinyl imidazole carrying metal-chelated beads for reversible use in yeast invertase adsorption. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 37, p. 88-94, 2005.
- OZSEKER, E. E.; AKKAYA, A. Development of a new antibacterial biomaterial by tetracycline immobilization on calcium-alginate beads. **Carbohydrate Polymers**, v. 151, p. 441-451, 2016.
- PANESAR, P. S.; KUMARI, S.; PANESAR, R. Potential Applications of Immobilized β -Galactosidase in Food Processing Industries. **Enzyme Research**, p. 1-16, 2010.
- PANG, S.; WU, Y.; ZHANG, X.; LI, B.; OUYANG, J.; DING, M. Immobilization of laccase via adsorption onto bimodal mesoporous Zr-MOF. **Process Biochemistry**, v. 51, p. 229-239, 2016.

- PATEL, S. K.; SELVARAJ, C.; MARDINA, P.; JEONG, J. H.; KALIA, V. C.; KANG, Y. C.; LEE, J. K. Enhancement of methanol production from synthetic gas mixture by *Methylosinus sporium* through covalent immobilization. **Applied Energy**, v. 171, p. 383-391, 2016.
- PAULA, C.; PEREIRA P. D. Milk nutritional composition and its role in human health. **Nutrition**, v. 30, p. 619-627, 2014.
- POPPE, J. K.; COSTA, A. P. O.; BRASIL, M. C.; RODRIGUES, R. C.; AYUB, M. A. Z. Multipoint covalent immobilization of lipases on aldehyde-activated support: Characterization and application in transesterification reaction. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 94, p. 57-62, 2013.
- POPPE, J. K.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; RODRIGUES, R. C.; AYUB, M. A. Z. Enzymatic reactors for biodiesel synthesis: Present status and future prospects. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 5, p. 511-525, 2015.
- PRESTES, R. C.; GOLUNSKI, S. M.; TONIAZZO, G.; KEMPKA, A. P.; DI LUCCIO, M. Caracterização da fibra de colágeno, gelatina e colágeno hidrolisado. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 15, p. 375-382, 2013.
- PRIETO, L. M.; RICORDI, R. G.; KUHN, R. C.; FOLETTO, E. L.; MAZUTTI, M. A.; BURKERT, C. A. V. Evaluation of β -galactosidase adsorption into pre-treated carbon. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 3, p. 26-29, 2014.
- RAHMAN, M. A.; CULSUM, U.; KUMAR, A.; GAO, H.; HU, N. Immobilization of a novel cold active esterase onto Fe_3O_4 -cellulose nano-composite enhances catalytic properties. **International journal of biological macromolecules**, v. 87, p. 488-497, 2016.
- RAJDEO, K.; HARINI, T.; LAVANYA, K.; FADNAVIS, N. W. Immobilization of pectinase on reusable polymer support for clarification of apple juice. **Food and Bioproducts Processing**, v. 99, p. 12-19, 2016.
- RAMOS, E. Z.; JÚNIOR, R. H. M.; DE CASTRO, P. F.; TARDIOLI, P. W.; MENDES, A. A.; FERNANDÉZ-LAFUENTE, R.; HIRATA, D. B. Production and immobilization of *Geotrichum candidum* lipase via physical adsorption on eco-friendly support: Characterization of the catalytic properties in hydrolysis and esterification reactions. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 118, p. 43-51, 2015.

- REDDY, J. P.; RHIM, J. W. Characterization of bionanocomposite films prepared with agar and paper-mulberry pulp nanocellulose. **Carbohydrate Polymers**, v. 110, p. 480-488, 2014.
- REJIKUMAR, S.; SUREKHA, D. Hydrolysis of lactose and milk whey using a fixed-bed reactor containing β -galactosidase covalently bound onto chitosan and cross-linked poly(vinyl alcohol). **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v. 36, p. 91-98, 2001.
- RHIM, J. W.; PARK, H. M.; HA, C. S. Bio-nanocomposites for food packaging applications. **Progress in Polymer Science**, v. 38, p. 1629-1652, 2013.
- RUEDA, N.; DOS SANTOS, C. S.; RODRIGUEZ, M. D.; ALBUQUERQUE, T. L.; BARBOSA, O.; TORRES, R.; ORTIZ, C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Reversible immobilization of lipases on octyl-glutamic agarose beads: A mixed adsorption that reinforces enzyme immobilization. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 128, p. 10-18, 2016.
- SANTIAGO, P. A.; MARQUES, L. B. S.; CARDOSO, V. L.; RIBEIRO, E. J.; Estudo da produção de β -galactosidase por fermentação de soro de queijo com *Kluyveromyces marxianus*. **Dissertação de mestrado**, Minas Gerais, 2004.
- SCHOFFER, J. D.; MATTE, C. R.; CHARQUEIRO, D. S.; DE MENEZES, E. W.; COSTA, T. M. H.; BENVENUTTI, E. V.; RODRIGUES, R. C.; HERTZ, P. F. Directed immobilization of CGTase: The effect of the enzyme orientation on the enzyme activity and its use in packed-bed reactor for continuous production of cyclodextrins. **Process Biochemistry**, v. 58, p. 120-127, 2017.
- SCHRIEBER, R.; GAREIS, H. Gelatine handbook: theory and industrial practice. **John Wiley & Sons**, 2007.
- SHANKAR, S.; RHIM, J. W. Preparation of nanocellulose from micro-crystalline cellulose: The effect on the performance and properties of agar-based composite films. **Carbohydrate polymers**, v. 135, p. 18-26, 2016.
- SHELDON, R. A. Enzyme Immobilization: The Quest for Optimum Performance. **Advanced Synthesis and Catalysis**, v. 349, p. 1289, 2007.
- SHELDON, R. A.; VAN PELT, S. Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. **Chemical Society Reviews**, v. 42, p. 6223, 2013.

- SHOSEYOV, O.; SHANI, Z.; LEVY, I. Carbohydrate binding modules: Biochemical properties and novel applications. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 70, p. 283-295, 2006.
- SIRISHA, V. L.; JAIN, A.; JAIN, A. Enzyme immobilization: an overview on methods, support material, and applications of immobilized enzymes. **Advances in food and nutrition research**, v. 79, p. 179-211, 2016.
- SIRÓ, I.; PLACKETT, D. Microfibrillated cellulose and new nanocomposite materials: a review. **Cellulose**, v. 17, p. 459-494, 2010.
- SONG, N.; CHEN, S.; HUANG, X.; LIAO, X.; SHI, B. Immobilization of catalase by using Zr(IV)-modified collagen fiber as the supporting matrix. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 2187-2193, 2011.
- SPAHN, C.; MINTEER, S. D. Enzyme Immobilization in Biotechnology. **Recent Patent in Engineering**, v. 2, p. 195-200, 2008.
- STRUMEYER, D. H.; CONSTANTINIDES, A.; FREUDENBERGER, J. Preparation and characterization of α -amylase immobilized on collagen membranes. **Journal of Food Science**, v. 39, p. 498-502, 1974.
- SULAIMAN, S.; CIEH, N. L.; MOKHTAR, M. N.; NAIM, M. N.; KAMAL, S. M. M. Covalent immobilization of cyclodextrin glucanotransferase on kenaf cellulose nanofiber and its application in ultrafiltration membrane system. **Process Biochemistry**, v. 55, p. 85-95, 2017.
- SYED, F.; ALI, K.; ASAD, M. J.; FRAZ, M. G.; KHAN, Z.; IMRAN, M.; TAJ, R.; AHMAD, A. Preparation and characterization of a green nano-support for the covalent immobilization of glucoamylase from *Neurospora sitophila*. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 162, p. 309-317, 2016.
- TANRISEVEN, A. S.; DOGAN, E. A novel method for the immobilization of de b-galactosidase. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 27-30, 2002.
- TELLO-SOLÍS, S. R.; JIMÉNEZ-GUZMÁN, J.; SARABIA-LEOS, C.; GÓMEZ-RUÍZ, L.; CRUZ-GUERRERO, A. E.; RODRÍGUEZ-SERRANO, G. M.; GARCÍA-GARIBAY, M. Determination of the secondary structure of *Kluyveromyces lactis* beta-galactosidase by circular dichroism and its structure-activity relationship as a function of the pH. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 10200-10204, 2005.

- TORRES-SALAS, P.; DEL MONTE-MARTINEZ, A.; CUTINO-AVILA, B.; RODRIGUEZ-COLINAS, B.; ALCALDE, M.; BALLESTEROS, A. O.; PLOU, F. J. Immobilized biocatalysts: novel approaches and tools for binding enzymes to supports. **Advanced Materials**, v. 23, n. 44, p. 5275-5282, 2011.
- TURKOVA, J.; BLAHA, K.; MALANIKOVA, M.; VANČUROVÁ, D.; ŠVEC, F.; KALAL, J. Methacrylate gels with epoxide groups as supports for immobilization of enzymes in pH range 3-12. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology**, v. 524, p. 162-169, 1978.
- USTOK, F. I.; TARI, C.; HARSA, S. Biochemical and thermal properties of b-galactosidase enzymes produced by artisanal yoghurt cultures. **Food Chemistry**, v. 119, p. 1114-1120, 2010.
- UTRAKI, L. A. Polymer Alloys and Blend: Thermodynamics and Rheology. **Hanser Publishers**, p. 1-27, 1990.
- VALERIO, S. G.; ALVES, J. S.; KLEIN, M. P.; RODRIGUES, R. C.; HERTZ, P. F. High operational stability of invertase from *Saccharomyces cerevisiae* immobilized on chitosan nanoparticles. **Carbohydrate polymers**, v. 92, p. 462-468, 2013.
- WAHBA, M. I. Treated calcium pectinate beads for the covalent immobilization of β -d-galactosidase. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 91, p. 877-886, 2016.
- WANG, M.; LIU, X.; JIA, Y. X.; WANG, X. L. The improvement of comprehensive transport properties to heterogeneous cation exchange membrane by the covalent immobilization of polyethyleneimine. **Separation and Purification Technology**, v. 140, p. 69-76, 2015.
- WARD, K.; XI, J.; STUCKEY, D. C. Immobilization of enzymes using non-ionic colloidal liquid aphrons (CLAs): Surface and enzyme effects. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 136, p. 424-430, 2015.
- WARMERDAM, A.; BENJAMINS, E.; DE LEEUW, T. F.; BROEKHUIS, T. A.; BOOM, R. M.; JANSSEN, A. E. Galacto-oligosaccharide production with immobilized β -galactosidase in a packed-bed reactor vs. free β -galactosidase in a batch reactor. **Food and Bioprocess Processing**, v. 92, p. 383-392, 2014.

WOLF, K. L. Propriedades físico-químicas e mecânicas de biofilmes elaborados a partir de fibra e pó de colágeno. **Dissertação de mestrado**. São José do Rio Preto (SP), Universidade Estadual Paulista, 2007.

WONG, S. Y.; HAERTEL, W. Crystallization in lactose refining-A Review. **Concise Reviews in Food Science**, v. 79, p. 257-272, 2014.

XU, R.; SI, Y.; WU, X.; LI, F.; ZHANG, B. Triclosan removal by laccase immobilized on mesoporous nanofibers: strong adsorption and efficient degradation. **Chemical Engineering Journal**, v. 255, p. 63-70, 2014.

YANG, H.; SHU, Z. The extraction of collagen protein from pigskin. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 6, p. 683-687, 2014.

ZANIN, G. M.; MORAES, F. F.; SAIAD, S.; PIETRO, R. C. L. R. Enzimas como Agentes Biotecnológicos, **Legis Summa**, Ribeirão Preto, cap. 4, p. 35-85. 2004.

ZHANG, Z.; ZHANG, R.; CHEN, L.; MCCLEMENTS, D. J. Encapsulation of lactase (β -galactosidase) into κ -carrageenan-based hydrogel beads: Impact of environmental conditions on enzyme activity. **Food chemistry**, v. 200, p. 69-75, 2016.

ZHU, S.; WU, Y.; CHEN, Q.; YU, Z.; WANG, C.; JIN, S.; WU, G. Dissolution of cellulose with ionic liquids and its application: a mini-review. **Green Chemistry**, v. 8, p. 325-327, 2006.

ANEXOS

Anexo 1. Patente depositada no Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI) do processo de modificação do colágeno e imobilização da β -galactosidase.

**Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de
Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT**

Número do Processo: BR 10 2017 001290 5

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: FUNDAÇÃO VALE DO TAQUARI DE EDUCAÇÃO E
DESENVOLVIMENTO SOCIAL FUVATES

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 04008342000109

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Rua Avelino Talli, nº 171 - Bairro Universitário

Cidade: Lajeado

Estado: RS

CEP: 95900-000

País: Brasil

Telefone: (51)3714-7000

Fax: (51)3714-7001

Email: custodio.poa@custodio.com.br

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): COMPOSIÇÃO CATALISADORA, PROCESSO DE PRODUÇÃO DE COMPOSIÇÃO CATALISADORA, PROCESSO DE OBTENÇÃO DE PRODUTOS COM BAIXO TEOR DE LACTOSE E USO DE COMPOSIÇÃO CATALISADORA

Resumo: A presente invenção descreve um processo de produção de produtos com baixo teor de lactose utilizando um biocatalisador imobilizado, de modo a permitir sua aplicação industrial e reutilização. Especificamente, a presente invenção compreende o uso da enzima β -galactosidase imobilizada em um suporte de colágeno funcionalizado. A presente invenção se situa nos campos de engenharia de alimentos, químico e farmacêutico.

Figura a publicar: 1

Dados do Procurador

Procurador:

Nome ou Razão Social: Ricardo Amaral Remer

Numero OAB:

Numero API: 1856

CPF/CNPJ: 71468374915

Endereço: Rua São José, 40, 4º andar

Cidade: Rio de Janeiro

Estado: RJ

CEP: 20010-020

Telefone: 21-3231-9062

Fax: 11-3231-9039

Email: remer@remer.com.br

Escritório:

Nome ou Razão Social: Remer Villaça & Nogueira Assessoria e Consultoria de Prop. Intelectual S/S Ltda.

CPF/CNPJ: 07336918000155

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 20/01/2017 às 15:29, Petição 870170004282

Dados do Inventor (72)

Inventor 1 de 4

Nome: CLAUZIA FERNANDA VOLKEN DE SOUZA

CPF: 71695346068

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Rua Avelino Tallini, 171 - Bairro Universitário

Cidade: Lajeado

Estado: RS

CEP: 95900-000

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email:

Inventor 2 de 4

Nome: GIANDRA VOLPATO

CPF: 02349598942

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Rua Henrique Dias, 194/303 - Bairro Bom Fim

Cidade: Porto Alegre

Estado: RS

CEP: 90035-100

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email:

Inventor 3 de 4

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 20/01/2017 às 15:29, Petição 870170004282

Nome: ADRIANO GENNARI

CPF: 02085972047

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Estudante de Graduação

Endereço: Rua Antônio Gallon, 129 - Bairro Planalto

Cidade: Guaporé

Estado: RS

CEP: 99200-000

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email:

Inventor 4 de 4

Nome: MICHELE RAMOS DUTRA ROSOLEN

CPF: 97049409049

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Linha Vitorino Monteiro, s/n - Interioro

Cidade: Vespasiano Corrêa

Estado: RS

CEP: 95972-000

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email:

Documentos anexados

Tipo Anexo	Nome
Relatório Descritivo	Relatório.pdf
Reivindicação	Reivindicações.pdf
Resumo	Resumo.pdf
Desenho	Figuras.pdf
Procuração	Procuração Univates - 06mar15.pdf
Comprovante de pagamento de GRU 200	GRU+Comprovante.pdf

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 20/01/2017 às 15:29, Petição 870170004282

Acesso ao Patrimônio Genético

- ☒ Declaração Negativa de Acesso - Declaro que o objeto do presente pedido de patente de invenção não foi obtido em decorrência de acesso à amostra de componente do Patrimônio Genético Brasileiro, o acesso foi realizado antes de 30 de junho de 2000, ou não se aplica.

Declaração de veracidade

- ☒ Declaro, sob as penas da lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em 20/01/2017 às 15:29, Petição 870170004282

Relatório Descritivo de Patente de Invenção

COMPOSIÇÃO CATALISADORA, PROCESSO DE PRODUÇÃO DE
COMPOSIÇÃO CATALISADORA, PROCESSO DE OBTENÇÃO DE PRODUTOS
COM BAIXO TEOR DE LACTOSE E USO DE COMPOSIÇÃO CATALISADORA

Campo da Invenção

[0001] A invenção apresenta um biocatalisador, o processo de obtenção deste biocatalisador e sua aplicação na obtenção de produtos com baixo teor de lactose, sendo o dito biocatalisador composto de uma enzima imobilizada em um suporte, no caso a enzima β -galactosidase, conhecida comercialmente como lactase, imobilizada em um suporte de colágeno em pó.

[0002] A presente invenção pertence ao campo de engenharia de alimentos, química e farmacêutica.

Antecedentes da Invenção

[0003] A imobilização de enzimas é uma alternativa para a aplicação eficiente desses biocatalisadores nas áreas alimentícia, química e farmacêutica. As enzimas são biocatalisadores altamente específicos, e por meio da imobilização suas características podem ser maximizadas e melhoradas. A tecnologia de imobilização possibilita que as enzimas possam ser reutilizadas diversas vezes, além disso, podem permitir que estas se tornem mais estáveis e resistentes às condições severas, principalmente de pH e temperatura. Em alguns casos de aplicações industriais de biocatalisadores, para prolongar a atividade enzimática ao longo do período do processo, é necessário imobilizá-los (Villeneuve et al., 2000; Pessela et al., 2007; Hanefeld et al., 2013).

[0004] Para aplicações economicamente viáveis de enzimas imobilizadas, deve-se considerar o tipo de suporte e o método de imobilização, pois esses fatores influenciam diretamente na atividade da enzima e subsequente reutilização do biocatalisador. A ligação de enzimas a suportes

sólidos pode ocorrer por adsorção, ligação covalente, encapsulamento, bem como combinações entre esses métodos. O material escolhido para ser utilizado como suporte deve proporcionar um ambiente inerte e biocompatível, não interferindo na estrutura nativa da proteína (Villeneuve et al., 2000; Kim et al., 2006; Pessela et al., 2007).

[0005] Vários suportes têm sido relatados na literatura para a imobilização de enzimas. Os materiais sintéticos utilizados são adequados para essa tecnologia devido a sua forma física e estrutura química, por outro lado, apresentam como desvantagem o custo elevado. Já o colágeno em pó é um material natural, de baixo custo, e não apresenta impacto ambiental, ou seja, pode facilmente ser degradado pelo meio ambiente (Mendes et al., 2011).

[0006] Na busca pelo estado da técnica em literaturas científica e patentária, foram encontrados os seguintes documentos que tratam sobre o tema:

[0007] O documento WO2008157624 revela um método capaz de hidrolisar a lactose e assim obter produtos com baixa concentração da mesma, porém sem ocorrer perda da enzima devido à dificuldade de recuperação da β -galactosidase. O método é composto por um suporte de polímero hidrofóbico ligado covalentemente a uma molécula hidrofílica que se liga covalentemente à β -galactosidase, gerando uma molécula insolúvel em água, possibilitando sua recuperação. Os polímeros hidrofílicos são poli(etileno), poliacetato de etileno vinil, copolímero de poliestireno/ácido acrílico, quitosana, com os grupos amino e carboxílicos modificados, assim como os grupos amino e carboxílicos presentes na lactase, que também são modificados para se apresentarem mais estáveis. Os materiais poliméricos apresentados nestes documentos são utilizados como suportes, os quais podem formar uma matriz de imobilização com boas características, por meio da combinação de sua forma física e de sua estrutura química. Por outro lado, as principais desvantagens destes materiais são o custo elevado para obtenção e, com exceção da quitosana, os demais

suportes apresentados neste documento necessitam de um longo tempo para serem biodegradados.

[0008] O documento WO2002083885 A1 revela um material com enzimas imobilizadas, obtido através da pulverização de um revestimento proteico ativo com um agente de ligações cruzadas para um suporte orgânico fibroso, com o objetivo de remover a lactose do leite de vaca. Para este processo, é escolhido um suporte com grande área superficial e inerente ao processo químico, onde é pulverizada uma mistura de agente de ligações cruzadas com a enzima e uma proteína carregadora, que será reticulada com o suporte. Como suporte, são citados algodão, seda, lã, celulose ou polímeros sintéticos. Os agentes de modificação utilizados na funcionalização dos suportes são materiais que adicionam grupamentos aldeídicos, sendo que a utilização destes reagentes em produtos que serão destinados à alimentação humana não é adequada, devido aos aspectos de toxicidade.

[0009] O documento US4066512A revela um filtro catalítico composto por uma matriz polimérica microporosa que apresenta uma enzima ou anticorpo ligado a ela, de modo a realizar a catálise dos substratos quando estes entrarem em contato com a matriz seja por fluxo ou difusão. Este documento também apresenta uma solução para a dificuldade de recuperação das enzimas, visto que elas permanecem ligadas à matriz. A invenção apresentada neste documento se limita aos reatores em coluna.

[0010] A aplicação da β -galactosidase de modo a apresentar uma alta atividade enzimática, possibilitar sua recuperação para ser reutilizada posteriormente, em algum processo industrial, é um alvo de estudos devido ser um problema constante no estado da técnica. Também existe uma preocupação com o uso de materiais biodegradáveis que causem um menor impacto ao meio ambiente e um menor custo.

[0011] Assim, do que se depreende da literatura pesquisada, não foram encontrados documentos antecipando ou sugerindo os ensinamentos da

presente invenção, de forma que a solução aqui proposta possui novidade e atividade inventiva frente ao estado da técnica.

Sumário da Invenção

[0012] Dessa forma, a presente invenção tem por objetivo resolver os problemas constantes no estado da técnica a partir do uso de uma técnica de imobilização de β -galactosidase em um suporte com colágeno em pó funcionalizado, tornando a enzima mais estável e possibilita que seja recuperada e reutilizada.

[0013] A presente invenção apresenta melhorias em relação ao estado da técnica.

[0014] O colágeno em pó modificado empregado na presente invenção, além de ser de baixo custo, é facilmente degradado pelo meio ambiente.

[0015] Entre os agentes de modificação do colágeno empregados na presente invenção está o sulfato de alumínio, o qual é utilizado no tratamento de potabilidade da água para o consumo humano e, sendo assim, sua aplicação não apresenta riscos à saúde dos consumidores.

[0016] Os tratamentos do suporte empregados na presente invenção proporcionam a ativação ou a modificação dos grupamentos químicos presentes na superfície do colágeno. Este processo permite que ocorra um aumento da afinidade da enzima com o suporte, de forma a melhorar a interação da mesma com o colágeno sem desnaturá-la. Esse efeito aumenta a força das ligações enzima-suporte, tornando o derivado mais resistente às condições operacionais e reacionais do processo de aplicação, e aumenta a capacidade de ligação da β -galactosidase por área do suporte.

[0017] A tecnologia de imobilização desenvolvida na presente invenção permite a utilização da enzima β -galactosidase imobilizada no colágeno no processo de hidrólise da lactose empregando diferentes reatores. O derivado obtido poderá ser utilizado em reatores de coluna, que podem ser de leito fixo ou de leito fluidizado, e também em tanques agitados. Ambos os tipos de reatores podem ser empregados tanto em processos contínuos quanto em

batelada. Nesse contexto, o processo de hidrólise da lactose, presente em leite e derivados, empregando a presente invenção, pode ser realizado por diferentes tipos de reatores e formas de processos.

[0018] Em um primeiro objeto, a presente invenção apresenta uma composição catalisadora que compreende β -galactosidase imobilizada em um suporte de colágeno em pó funcionalizado.

[0019] Em um segundo objeto, a presente invenção apresenta um processo de produção de composição catalisadora que apresenta pelo menos uma etapa de funcionalização do colágeno com pelo menos um composto do grupo consistido em: sais de alumínio, sais de ferro (III), ácido acético, glutaraldeído, agentes quelantes ou uma combinação destes, e uma etapa de fixação da β -galactosidase no colágeno.

[0020] Em um terceiro objeto, a presente invenção apresenta um processo de obtenção de produtos com baixo teor de lactose que compreende pelo menos uma etapa de contato entre pelo menos uma composição catalisadora e pelo menos um produto alimentício compreendendo lactose.

[0021] Em um quarto objeto, a presente invenção apresenta o uso de composição catalisadora para diminuir o teor de lactose de um produto.

[0022] Ainda, o conceito inventivo comum a todos os contextos de proteção reivindicados é a composição catalisadora compreendendo β -galactosidase imobilizada em colágeno funcionalizado.

[0023] Estes e outros objetos da invenção serão imediatamente valorizados pelos versados na arte e pelas empresas com interesses no segmento, e serão descritos em detalhes suficientes para sua reprodução na descrição a seguir.

Breve Descrição das Figuras

[0024] São apresentadas as seguintes figuras:

[0025] A Figura 1 mostra os resultados dos ensaios de reuso na hidrólise da lactose presente em uma solução de lactose (5% m/v) empregando a

β -galactosidase imobilizada em colágeno em pó funcionalizado com sulfato de alumínio (Col-Al), com sulfato de alumínio + glutaraldeído (Col-Al-Glu), ou com glutaraldeído (Col-Glu): percentuais de hidrólise e atividade relativa da enzima imobilizada após cada ciclo.

[0026] A Figura 2 mostra os resultados dos ensaios de reuso na hidrólise da lactose presente no permeado de soro de queijo, empregando a β -galactosidase imobilizada em colágeno em pó funcionalizado com sulfato de alumínio (Col-Al), com sulfato de alumínio + glutaraldeído (Col-Al-Glu), ou com glutaraldeído (Col-Glu): percentuais de hidrólise e atividade relativa da enzima imobilizada após cada ciclo.

[0027] A Figura 3 mostra os resultados dos ensaios de reuso na hidrólise da lactose presente no soro de queijo, empregando a β -galactosidase imobilizada em colágeno em pó funcionalizado com sulfato de alumínio (Col-Al), com sulfato de alumínio + glutaraldeído (Col-Al-Glu), ou com glutaraldeído (Col-Glu): percentuais de hidrólise e atividade relativa da enzima imobilizada após cada ciclo.

[0028] A Figura 4 mostra ensaios de pH operacional na temperatura de 4 °C da β -galactosidase livre e imobilizada em colágeno funcionalizado por diferentes tratamentos (Col-Glu, Col-Al-Glu (120 mg) e Col-Al (120 mg)).

[0029] A Figura 5 mostra ensaios de pH operacional na temperatura de 37 °C da β -galactosidase livre e imobilizada em colágeno funcionalizado por diferentes tratamentos (Col-Glu, Col-Al-Glu (120 mg) e Col-Al (120 mg)).

[0030] A Figura 6 mostra ensaios de temperatura operacional da β -galactosidase livre e imobilizada em colágeno funcionalizado por diferentes tratamentos (Col-Glu, Col-Al-Glu (120 mg) e Col-Al (120 mg)).

[0031] A Figura 7 mostra ensaios de estabilidade ao armazenamento a 4 °C da β -galactosidase livre e imobilizada em colágeno modificado por diferentes tratamentos (Col-Glu, Col-Al-Glu (120 mg) e Col-Al (120 mg)).

Descrição Detalhada da Invenção

[0032] O presente projeto tem como objeto um método de imobilização da enzima β -galactosidase, conhecida comercialmente como lactase, que compreende a utilização de colágeno em pó, associado a um suporte de baixo custo e de origem natural, na imobilização da enzima β -galactosidase, que poderá ser empregada e utilizada por diversas vezes em reações de hidrólise da lactose de leite e derivados, com vistas à obtenção de produtos com baixo teor de lactose. O uso do colágeno em pó como suporte reduz o custo do processo de imobilização da β -galactosidase, possibilitando a aplicação da enzima imobilizada em escala industrial nos laticínios.

[0033] A imobilização enzimática, ou seja, a ligação da enzima a um material sólido e insolúvel, denominado de suporte, vem sendo o método de maior sucesso proposto para superar limitações relacionadas ao custo elevado e recuperação das enzimas após a aplicação (se apresentam solúveis e em baixas concentrações), uma vez que estabiliza a estrutura da enzima e, conseqüentemente, sua atividade. Além disto, esta técnica viabiliza a utilização de biocatalisadores em escala industrial, pois possibilita a recuperação da enzima, reutilização do suporte, redução de custos, facilidade na interrupção da reação enzimática, e em alguns casos pode melhorar o desempenho do biocatalisador e reduzir significativamente a inativação da enzima por influência da temperatura e solventes orgânicos.

[0034] O suporte a ser utilizado para imobilização deve possuir grupos químicos que possam ser ativados ou modificados, permitindo a ligação da enzima sem desnaturá-la. Os materiais sintéticos utilizados para imobilização de enzimas são considerados suportes adequados devido as suas formas físicas e estruturas químicas, por outro lado, apresentam como desvantagem, para aplicação industrial, o custo elevado. Já o colágeno em pó é um material natural, de baixo custo, e não apresenta impacto ambiental, ou seja, pode facilmente ser degradado pelo meio ambiente.

[0035] A imobilização de enzimas é uma alternativa para a aplicação eficiente de biocatalisadores. As enzimas são biocatalisadores altamente

específicos, e por meio da imobilização suas características podem ser maximizadas e melhoradas. A tecnologia de imobilização possibilita que as enzimas possam ser reutilizadas diversas vezes, além disso, podem permitir que estas se tornem mais estáveis e resistentes às condições severas, principalmente de pH e temperatura. Em alguns casos de aplicações industriais de biocatalisadores, para prolongar a atividade enzimática ao longo do período do processo, é necessário imobilizá-los.

[0036] O colágeno é uma proteína orgânica pouco solúvel, na sua forma natural organizada em fibras resistentes, tradicionalmente encontrado na pele, tendões, ligamentos e ossos. Os principais estudos com este material são voltados para a melhoria de suas propriedades físicas, físico-químicas, mecânicas e de processamento.

[0037] Por conter abundantes grupos funcionais, tais como -OH, -COOH, e -NH₂, a estrutura do colágeno pode ser modificada para ativar esses grupamentos, melhorando sua interação com outras proteínas. Além disso, o colágeno possui a capacidade de reagir com diversos íons metálicos, tais como Fe (III), Al (III) e Zr (IV). A ligação destes íons metálicos é a primeira etapa de uma das possíveis modificações do colágeno; essa reação é realizada para aumentar a estabilidade e a afinidade da enzima, que ocorre devido à interação quelante entre o íon ligado e a enzima.

[0038] Para o processo de modificação do suporte colágeno em pó são usados três métodos diferentes, bem como combinações entre esses, visando à funcionalização do colágeno. Os métodos envolvem a funcionalização do colágeno com sais de alumínio (podendo ser utilizado sais de ferro (III)), ácido acético (sendo uma alternativa para o uso do ácido a utilização de uma solução de ácido etileno diaminotetraacético (EDTA)), outros agentes quelantes e glutaraldeído.

[0039] Em um primeiro objeto, a presente invenção apresenta uma composição catalisadora que compreende β -galactosidase imobilizada em um suporte de colágeno em pó funcionalizado.

[0040] Em uma concretização o suporte é de colágeno em pó funcionalizado por pelo menos um composto do grupo consistido em: sais de alumínio, sais de ferro (III), ácido acético, glutaraldeído, agentes quelantes ou uma combinação destes.

[0041] Em um segundo objeto, a presente invenção apresenta um processo de produção de composição catalisadora que apresenta pelo menos uma etapa de funcionalização do colágeno com pelo menos um composto do grupo consistido em: sais de alumínio, sais de ferro (III), ácido acético, glutaraldeído, agentes quelantes ou uma combinação destes, e uma etapa de fixação da β -galactosidase no colágeno.

[0042] Em uma concretização o processo de produção de composição catalisadora compreende pelo menos uma etapa de:

- a) funcionalização do colágeno, que compreende a adição de 1 g de colágeno em pó a cada 300 mL de água ultrapura com pH pré-ajustado para uma faixa de 1,7 a 2,0 com ácido acético;
- b) repouso em temperatura ambiente durante uma faixa de tempo entre 20 a 28 horas, preferencialmente 24 horas;
- c) adição de 3,5 mmol de $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$;
- d) incubação, numa faixa de temperatura de 25 a 35°C, preferencialmente 30°C, com agitação constante durante uma faixa de 2 a 5 horas, preferencialmente 4 horas;
- e) ajuste de pH da solução para uma faixa entre 4,0 a 4,5;
- f) incubação da mistura em uma faixa de temperatura entre 35 a 45 °C, preferencialmente 40 °C durante uma faixa de tempo de 2 a 6 horas, preferencialmente 4 horas;
- g) separação do colágeno por centrifugação (2510 xg, 5 min);
- h) lavagem em água ultrapura.

[0043] Em uma concretização o processo de produção de composição catalisadora compreende pelo menos uma etapa de:

a) funcionalização do colágeno pela adição de glutaraldeído numa concentração de 5% em peso durante uma faixa de 1 a 4 horas, preferencialmente 1 hora;

b) lavagem do colágeno usando água ultrapura seguido de lavagem com tampão fosfato 100 mM (pH 7,0);

c) armazenamento em solução tampão, preferencialmente solução tampão fosfato 100 mM (pH 7,0);

[0044] Em uma concretização o processo de produção de composição catalisadora compreende pelo menos uma etapa de:

a) funcionalização do colágeno pela incubação do colágeno em uma solução a 10% (m/v) de ácido acético por uma faixa de tempo entre 1 a 5 horas, preferencialmente 1 hora;

b) centrifugação do material obtido em (a) (2510 xg, 5 min);

c) repetição da etapa (a) e (b) por mais duas vezes;

d) lavagem com água ultrapura seguido de lavagem com solução tampão, preferencialmente solução tampão fosfato 100 mM (pH 7,0).

[0045] Em uma concretização o processo de produção de composição catalisadora compreende pelo menos uma etapa de:

a) adição de 1 g de colágeno funcionalizado a cada 30 mL de solução enzimática (50 U/mL) da β -galactosidase em tampão fosfato 100 mM (pH 7,0);

b) repouso da mistura em uma faixa de temperatura entre 2 a 6°C, preferencialmente 4 °C por uma faixa de tempo entre 10 e 14 horas, mais preferencialmente 12 horas,

c) centrifugação a 2370 xg durante 5 minutos;

d) centrifugação por mais três vezes com água ultrapura;

e) centrifugação em solução tampão, preferencialmente solução tampão fosfato 100 mM (pH 7,0).

[0046] Em um terceiro objeto, a presente invenção apresenta um processo de obtenção de produtos com baixo teor de lactose que compreende

pelo menos uma etapa de contato entre pelo menos uma composição catalisadora e pelo menos um produto alimentício compreendendo lactose.

[0047] Em uma concretização do processo de obtenção de produtos com baixo teor de lactose, a composição catalisadora é:

- adicionada na forma de grânulos ao produto contendo lactose; ou
- organizada em uma coluna, na qual passará o produto contendo lactose.

[0048] Em um quarto objeto, a presente invenção apresenta o uso de composição catalisadora para diminuir o teor de lactose de um produto.

[0049] Por biocatalisador, entende-se enzima. Por composição catalisadora, entende-se uma composição de enzima e um suporte, sendo que a enzima está imobilizada. Por enzima, entende-se substância orgânica de natureza proteica que tem a capacidade de catalisar reações químicas.

Exemplos - Concretizações

[0050] Os exemplos aqui mostrados têm o intuito somente de exemplificar uma das inúmeras maneiras de se realizar a invenção, contudo sem limitar, o escopo da mesma.

Processo de modificação do colágeno

[0051] Inicialmente 1 g de colágeno foi funcionalizado seguindo a técnica de cada tratamento, que pode ser utilizando $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$, Glutaraldeído, Ácido acético ou uma combinação destes.

[0052] Modificação por $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$: 1 g de colágeno em pó foi adicionado em 300 mL de água ultrapura, a mistura permaneceu à temperatura ambiente durante 24 h. O pH da água ultrapura foi pré-ajustado para 1,7-2,0 com ácido acético. Após esse período, foi feita a adição de 3,5 mmol de $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ e o material foi incubado numa temperatura de 30 °C com agitação constante durante 4 h. Uma quantidade adequada de uma solução saturada de NaHCO_3 foi gradualmente adicionada durante 2 h, a fim de aumentar o pH da solução para 4,0 - 4,5. Concluída esta etapa, a mistura foi incubada a 40 °C durante mais 4 h. Quando a reação se completou, o colágeno em pó foi separado por

centrifugação (2510 xg, 5 min), lavado em água ultrapura e posteriormente lavado e armazenado em tampão fosfato 0,1 M pH 7,0.

[0053] Modificação por Glutaraldeído: O colágeno em pó também foi funcionalizado utilizando o agente de ligações cruzadas glutaraldeído numa concentração de 5% (v/v) durante 1 h, com posteriores lavagens com água ultrapura e tampão fosfato pH 7,0 e após foi armazenado em solução tampão.

[0054] Modificação por Ácido acético: incubação do colágeno em uma solução a 10% (m/v) de ácido acético por 1 h, esse processo foi realizado durante 3 h (3 períodos de 1 h), após cada período foi realizada a separação do material por centrifugação (2510 xg, 5 min), e ao final, o colágeno foi lavado com água ultrapura e após com tampão fosfato.

[0055] Uma alternativa para o uso do ácido acético seria a utilização de uma solução de ácido etileno diaminotetraacético (EDTA) que é um agente quelante e vem sendo utilizado para desmineralização de compostos sólidos. Outros agentes quelantes também poderiam ser usados para fazer a remoção dos minerais.

[0056] Ferro (III) pode ser utilizado como substituinte ao uso de alumínio.
Processo de imobilização da enzima

[0057] Para o processo de imobilização 1 g de colágeno funcionalizado foi misturado com 30 mL de solução enzimática (50 U/mL) da β -galactosidase em tampão fosfato 100 mM (pH 7,0). A mistura foi mantida a 4 °C por 12 horas. Após esse período a β -galactosidase imobilizada foi separada por centrifugação 2370 xg durante 5 minutos e em seguida lavada três vezes com água ultrapura e uma vez com tampão fosfato 100 mM (pH 7,0). Ao final, o material foi armazenado em solução de tampão fosfato a 4 °C para posterior utilização.

[0058] Foram testados, além dos métodos que utilizam apenas o sulfato de alumínio, ou o glutaraldeído ou o ácido acético para tratamento do colágeno em pó, técnicas que combinam mais de um tratamento. Além disso, também foi estudado o comportamento do complexo quando adicionado de uma

quantidade maior de sulfato de alumínio (de 120 para 800 mg). Os resultados dos experimentos realizados estão apresentados na Tabela 1, que mostra o rendimento e a eficiência atingidos após o processo de imobilização em colágeno tratado pelos diferentes métodos:

- sulfato de alumínio na quantidade de 120 mg (Col-Al (120 mg));
- sulfato de alumínio na quantidade de 800 mg (Col-Al (800 mg));
- sulfato de alumínio na quantidade de 120 mg + glutaraldeído (Col-Al-Glu (120 mg));
- sulfato de alumínio na quantidade de 800 mg + glutaraldeído (Col-Al-Glu (800 mg));
- ácido acético + sulfato de alumínio na quantidade de 120 mg (Col-HAc-Al (120 mg));
- ácido acético + sulfato de alumínio na quantidade de 800 mg (Col-HAc-Al (800 mg));
- ácido acético + sulfato de alumínio na quantidade de 120 mg + glutaraldeído (Col-HAc-Al-Glu (120 mg));
- ácido acético + sulfato de alumínio na quantidade de 800 mg + glutaraldeído (Col-HAc-Al-Glu (800 mg));
- ácido acético (Col-HAc);
- ácido acético + glutaraldeído (Col-HAc-Glu);
- glutaraldeído (Col-Glu).

[0059] Observou-se que nos complexos que receberam a maior quantidade (800 mg) de sulfato de alumínio, o rendimento de imobilização foi maior. Já em relação à eficiência de imobilização, que demonstra a percentagem da enzima que foi imobilizada e ainda permaneceu ativa, verificou-se comportamento oposto, ou seja, a eficiência de imobilização foi maior nos tratamentos que empregaram a menor quantidade (120 mg) de sulfato de alumínio. Outro fator observado foi que, com exceção dos testes Col-HAc-Al-Glu com 120 e com 800 mg de sulfato de alumínio, a utilização do glutaraldeído resultou em um aumento da eficiência da imobilização, indicando

que seu uso pode contribuir com a estabilidade da estrutura tridimensional da enzima, evitando que ocorram mudanças conformacionais durante o processo de imobilização.

Tabela 1. Resultados de rendimento e eficiência dos processos de imobilização da β -galactosidase nos diferentes tratamentos estudados com colágeno em pó.

Tratamento	Rendimento (%)	Eficiência (%)
Col-Al (120 mg)	26,90 \pm 0,62 ^{de}	27,62 \pm 2,53 ^d
Col-Al (800 mg)	44,17 \pm 0,36 ^a	21,20 \pm 1,38 ^{ef}
Col-Al-Glu (120 mg)	25,55 \pm 1,86 ^{de}	51,67 \pm 3,15 ^b
Col-Al-Glu (800 mg)	26,54 \pm 0,24 ^{de}	43,03 \pm 1,19 ^c
Col-HAc-Al (120 mg)	28,59 \pm 0,77 ^{cde}	26,55 \pm 0,65 ^{de}
Col-HAc-Al (800 mg)	35,54 \pm 3,48 ^b	28,70 \pm 1,64 ^d
Col-HAc-Al-Glu (120 mg)	24,05 \pm 0,80 ^e	26,00 \pm 1,14 ^{de}
Col-HAc-Al-Glu (800 mg)	25,08 \pm 1,60 ^{de}	16,84 \pm 0,45 ^f
Col-HAc	29,85 \pm 0,47 ^{cd}	24,60 \pm 1,01 ^{de}
Col-HAc-Glu	33,63 \pm 2,13 ^{bc}	29,42 \pm 1,86 ^d
Col-Glu	28,45 \pm 1,69 ^{cde}	58,27 \pm 1,74 ^a

* Cada valor representa a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes realizados em triplicata. Letras diferentes na mesma coluna representam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

[0060] A partir dos resultados obtidos em relação à eficiência dos complexos formados, os tratamentos Col-Glu, Col-Al-Glu (120 mg) e Col-Al (120 mg) foram escolhidos para serem submetidos aos ensaios de:

- estudo dos parâmetros cinéticos;
- estabilidade térmica;
- avaliação do pH operacional;
- avaliação da temperatura operacional;
- estabilidade ao armazenamento;
- reusabilidade para a hidrólise da lactose.

[0061] Os parâmetros cinéticos (K_m e V_{max}) da enzima livre e imobilizada no colágeno tratado por diferentes métodos estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Resultados dos parâmetros cinéticos da β -galactosidase livre e imobilizada em colágeno funcionalizado por diferentes tratamentos (Col-Glu, Col-Al-Glu (120 mg) e Col-Al (120 mg)).

Tratamento	K_m (mM)	V_{max} (mM.min ⁻¹)
Col-Al (120 mg)	5,95 \pm 0,71	21,02 \pm 1,78
Col-Al-Glu (120 mg)	4,71 \pm 0,45	20,42 \pm 0,70
Col-Glu	4,63 \pm 0,44	14,90 \pm 1,16
Enzima Livre	4,35 \pm 0,13	148,84 \pm 10,34

[0062] Os dados encontrados nesse estudo indicaram um aumento da constante de Michaelis-Menten de 4,35 mM na enzima livre para até 5,95 mM no complexo Col-Al (120 mg). Em relação à velocidade máxima, uma expressiva redução foi observada após o processo de imobilização, essa redução pode ser atribuída a questões difusionais, e a dificuldade dos substratos em acessar o sítio da enzima imobilizada por possíveis alterações em sua estrutura tridimensional, o que resulta no bloqueio de alguns centros ativos após a imobilização, o que reduz a velocidade da reação, provocando a diminuição dos valores de V_{max} (Zhou e Chen, 2001).

[0063] Os parâmetros termodinâmicos para as enzimas livre e imobilizadas, em Col-Al (120 mg), Col-Al-Glu (120 mg) e Col-Glu, nas temperaturas de 50, 55 e 60 °C são apresentados na Tabela 3. A determinação dos parâmetros termodinâmicos auxilia na compreensão do mecanismo de desnaturação da enzima, o qual é muito importante em processos enzimáticos, assim como o efeito da temperatura na taxa de desnaturação enzimática (Ortega et al., 2004).

Tabela 3. Parâmetros termodinâmicos da β -galactosidase na forma livre e imobilizada em colágeno funcionalizado por diferentes tratamentos (Col-Glu, Col-Al-Glu (120 mg) e Col-Al (120 mg)).

T (°C)	k (min ⁻¹)	t _{1/2} (min)	ΔG (kJ.mol ⁻¹)	ΔH (kJ.mol ⁻¹)	ΔS (J.mol ⁻¹ .K ⁻¹)	E _a (kJ.mol ⁻¹)
Enzima livre						
50	0,0242	28,64	89,31	6,05	-257,79	8,73
55	0,1297	5,34	90,74	6,01	-258,33	
60	0,8144	0,85	92,16	5,96	-258,85	
Col-Al (120 mg)						
50	0,1846	3,75	83,86	1,26	-255,71	3,95
55	0,6822	1,02	85,20	1,22	-256,03	
60	0,8744	0,79	86,54	1,18	-256,33	
Col-Al-Glu (120 mg)						
50	0,0515	13,46	89,63	5,30	-261,08	7,99
55	0,3734	1,86	91,06	5,26	-261,59	
60	0,4934	1,40	92,49	5,22	-262,08	
Col-Glu						
50	0,0612	11,33	86,82	4,52	-254,80	7,21
55	0,8717	0,80	88,21	4,48	-255,27	
60	1,0294	0,67	89,60	4,44	-255,72	

[0064] Para a temperatura de 60 °C, os resultados do tempo de meia vida ($t_{1/2}$) e da constante de inativação (k) mostram que o processo de imobilização da β-galactosidase em colágeno tratado com sulfato de alumínio (na quantidade de 120 mg) + glutaraldeído aumentou a estabilidade térmica da enzima.

[0065] Os valores da E_a diminuíram após o processo de imobilização, indicando que uma menor quantidade de energia é necessária para desnaturar a enzima imobilizada. De acordo com Cobos e Estrada (2003), o valor de E_a é a energia necessária para alterar a conformação da enzima. O aumento dos valores de ΔG, com o aumento da temperatura de 50 até 60 °C, tanto para a enzima livre como para a enzima imobilizada nos diferentes suportes (Col-Glu, Col-Al-Glu (120 mg) e Col-Al (120 mg)), indica uma estabilização progressiva das moléculas com a temperatura. A desnaturação ocorre quando o ΔG

assume um valor baixo, indicando que o estado assumido apresenta menos energia disponível, em função da desnaturação, quando comparado com o estado inicial (Modell e Reid, 1983). Após o processo de imobilização da β -galactosidase houve uma redução nos valores de ΔH em todos os complexos, indicando que este procedimento causou alguma modificação na estrutura tridimensional da enzima, o que a desestabilizou. De acordo com Ortega et al. (2004), a entalpia pode ser correlacionada com o número de ligações não-covalentes rompidas durante o processo de desnaturação das proteínas. Em relação ao valor de ΔS , nas temperaturas estudadas, não foi observada grande variação entre a enzima livre e a imobilizada nos diferentes tratamentos (Col-Glu, Col-Al-Glu (120 mg) e Col-Al (120 mg)), indicando que não houve alteração na desordem do sistema após a desnaturação.

[0066] As Figuras 4 e 5 mostram o efeito do pH na atividade catalítica da β -galactosidase. Comparando o comportamento das enzimas livre e imobilizada nos diferentes tratamentos (Col-Glu, Col-Al-Glu (120 mg) e Col-Al (120 mg)), observou-se que não houve grande alteração nas propriedades catalíticas após o processo de imobilização em nenhuma das temperaturas, isso evidencia que o microambiente do suporte não tem influência sobre a enzima. Para a temperatura de 4 °C (Figura 4), verifica-se que as enzimas apresentam uma maior sensibilidade ao pH 7,5; essa alteração pode ser explicada pelo fato de que baixas temperaturas acabam desfavorecendo a atividade da enzima e dessa forma tornam-se mais sensíveis a alguns valores de pH. Para valores de pH próximos à 4,5 as enzimas livres e imobilizadas nos diferentes tratamentos (Col-Glu, Col-Al-Glu (120 mg) e Col-Al (120 mg)) apresentaram baixa atividade. Isso ocorreu principalmente devido ao fato que o ponto isoelétrico da β -galactosidase de *K. lactis* é de aproximadamente 5,42 e dessa forma, a enzima é desnaturada nessa condição de pH (Zhou e Chen, 2001).

[0067] A Figura 6 apresenta o comportamento das enzimas quando incubadas em diferentes temperaturas e no pH=7,0. Sabe-se que com o

aumento da temperatura, a velocidade de reação também aumenta. Contudo, devido à fraca estrutura das enzimas, elas podem sofrer alterações com a elevação da temperatura causando uma redução na sua atividade catalítica (Delanoy et al., 2003).

[0068] O perfil de comportamento da enzima nas diferentes temperaturas não apresentou grande variação após o processo de imobilização. Quando incubada a 40 °C (temperatura ótima da enzima), tanto a β -galactosidase livre quanto a imobilizada no colágeno submetido aos diferentes tratamentos (Col-Glu, Col-Al-Glu (120 mg) e Col-Al (120 mg)) apresentaram aproximadamente 60% da sua atividade. Na temperatura de 50 °C foram obtidas as maiores atividades, tanto para enzima livre quanto para a imobilizada em colágeno funcionalizado por diferentes tratamentos (Col-Glu, Col-Al-Glu (120 mg) e Col-Al (120 mg)). Isso pode ser atribuído às questões difusionais, a enzima é mais facilmente distribuída pela solução em temperaturas mais elevadas. A perda de atividade observada a 60 °C pode ser atribuída à desnaturação das moléculas da enzima, resultando na ruptura das cadeias polipeptídicas (Ansari et al., 2013).

[0069] A etapa de armazenamento dos biocatalisadores em condições ideais tem uma grande importância para que possam desempenhar suas funções com a maior eficiência possível (Zanin et al., 2004). A Figura 7 apresenta os resultados da estabilidade ao armazenamento a 4 °C da β -galactosidase livre e imobilizada em colágeno funcionalizado por diferentes tratamentos (Col-Glu, Col-Al-Glu (120 mg) e Col-Al (120 mg)). Pode-se observar que após 100 dias de armazenamento as enzimas imobilizadas apresentam um comportamento muito semelhante, todas mantiveram mais de 50% da sua atividade inicial, sendo que o complexo obtido na imobilização com Col-Al-Glu foi o que apresentou maior estabilidade, retendo em torno de 60% da atividade inicial da enzima.

Ensaio de hidrólise da lactose

[0070] Nos ensaios de hidrólise foram utilizadas 500 mg de derivado (colágeno modificado + β -galactosidase) para hidrolisar 20 mL de cada uma das soluções (lactose, permeado e soro de queijo) que foram reconstituídas a 5% (m/v) de lactose. Seguindo as quantidades utilizadas nos experimentos, para a hidrólise em 1 litro de solução contendo os mesmos 5% de lactose são necessários 25 g do derivado contendo a enzima imobilizada.

[0071] Ensaios de hidrólise da lactose (de uma solução de lactose, do permeado de soro de queijo, e do soro de queijo) pela enzima imobilizada podem ser observados nas Figuras 1, 2 e 3. Os ensaios de hidrólise foram realizados empregando a β -galactosidase imobilizada em colágeno em pó funcionalizado: com sulfato de alumínio (Col-Al), com sulfato de alumínio + glutaraldeído (Col-Al-Glu), ou com glutaraldeído (Col-Glu). A Figura 1 apresenta os resultados obtidos a partir da hidrólise da lactose de uma solução de lactose pura a 5% (m/v) empregando os três diferentes derivados. A Figura 2 demonstra os resultados de hidrólise de uma solução de permeado de soro de queijo (reconstituído a 5% (m/v) de lactose) empregando os três diferentes derivados. Na Figura 3 os resultados apresentados foram obtidos a partir da hidrólise realizada em uma solução de soro de queijo (reconstituído a 5% (m/v) de lactose) empregando os três diferentes derivados.

[0072] Observou-se que o complexo obtido a partir do tratamento do colágeno com alumínio e glutaraldeído (Col-Al-Glu) foi o que apresentou maiores valores de hidrólise, além de ter possibilitado um maior número de reusos do derivado (enzima imobilizada), quando comparado com as modificações feitas somente com alumínio (Col-Al) ou somente com glutaraldeído (Col-Glu). Isso indica que as ligações químicas entre a enzima e o colágeno formadas após esse tratamento (com alumínio e glutaraldeído (Col-Al-Glu)) resultaram em um complexo mais estável. Isso provavelmente ocorreu devido a uma combinação do efeito quelante do íon alumínio com as ligações cruzadas formadas pelo glutaraldeído.

[0073] A matriz produzida a partir dos conhecimentos aqui revelados pode ser utilizada na forma de grânulos sendo adicionada ao meio reacional em tanques de agitação ou esses grânulos podem ser usados para preencher uma coluna, por onde passará o produto contendo o substrato a lactose que será hidrolisada.

[0074] Os versados na arte valorizarão os conhecimentos aqui apresentados e poderão reproduzir a invenção nas modalidades apresentadas e em outras variantes, abrangidas no escopo das reivindicações anexas.

Reivindicações

1. Composição catalisadora **caracterizada** por ser β -galactosidase imobilizada em um suporte de colágeno em pó funcionalizado.

2. Composição catalisadora de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** pelo colágeno em pó ser funcionalizado por pelo menos um composto do grupo consistido em: sais de alumínio, sais de ferro (III), ácido acético, glutaraldeído, agentes quelantes ou uma combinação destes.

3. Processo de produção de composição catalisadora conforme definido na reivindicação 1 ou 2, **caracterizado** por compreender pelo menos uma etapa de funcionalização do colágeno com pelo menos um composto do grupo consistido em: sais de alumínio, sais de ferro (III), ácido acético, glutaraldeído, agentes quelantes ou uma combinação destes, e uma de etapa de fixação da β -galactosidase no colágeno.

4. Processo de produção de composição catalisadora de acordo com a reivindicação 3, **caracterizado** por compreender pelo menos uma etapa de:

a) funcionalização do colágeno, que compreende a adição de 1 g de colágeno em pó a cada 300 mL de água ultrapura com pH pré-ajustado para um faixa de 1,7 a 2,0 com ácido acético;

b) repouso em temperatura ambiente durante uma faixa de tempo entre 20 a 28 horas;

c) adição de 3,5 mmol de $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$;

d) incubação, numa faixa de temperatura de 25 a 35 °C, com agitação constante durante uma faixa de 2 a 5 horas;

e) ajuste de pH da solução para uma faixa entre 4,0 a 4,5;

f) incubação da mistura em uma faixa de temperatura entre 35 a 45 °C, durante uma faixa de tempo de 2 a 6 horas;

g) separação do colágeno por centrifugação (2510 xg, 5 min);

h) lavagem em água ultrapura.

5. Processo de produção de composição catalisadora de acordo com a reivindicação 3, **caracterizado** por compreender pelo menos uma etapa de:

- a) funcionalização do colágeno pela adição de glutaraldeído numa concentração de 5% em peso durante uma faixa 1 a 4 horas;
- b) lavagem do colágeno usando água ultrapura seguido de lavagem com tampão fosfato 100 mM (pH 7,0);
- c) armazenamento em solução tampão fosfato 100 mM (pH 7,0);

6. Processo de produção de biocatalisador de acordo com a reivindicação 3, **caracterizado** por compreender pelo menos uma etapa de:

- a) funcionalização do colágeno pela incubação do colágeno em uma solução a 10% (m/v) de ácido acético por uma faixa de tempo entre 1 a 5 horas;
- b) centrifugação do material obtido em (a)
- c) repetição da etapa (a) e (b) por mais duas vezes;
- d) lavagem com água ultrapura seguido de lavagem com solução tampão.

7. Processo de produção de composição catalisadora de acordo com qualquer uma das reivindicações de 3 a 6, **caracterizado** por compreender pelo menos uma etapa de:

- a) adição de 1 g de colágeno funcionalizado a cada 30 mL de solução enzimática (50 U/mL) da β -galactosidase em tampão fosfato 100 mM (pH 7,0);
- b) repouso da mistura em uma faixa de temperatura entre 2 a 6°C, por uma faixa de tempo entre 10 e 14 horas;
- c) centrifugação;
- d) centrifugação por mais três vezes com água ultrapura;
- e) centrifugação em solução tampão fosfato 100 mM (pH 7,0).

8. Processo de obtenção de produtos com baixo teor de lactose **caracterizado** por compreender pelo menos uma etapa de contato entre pelo

menos uma composição catalisadora conforme definido na reivindicação 1 e pelo menos um produto alimentício compreendendo lactose.

9. Processo de obtenção de produtos com baixo teor de lactose de acordo com a reivindicação 6, **caracterizado** pela composição catalisadora:

- ser adicionada na forma de grânulos ao produto contendo lactose; ou
- estar organizada em uma coluna, na qual passará o produto contendo lactose.

10. Uso de composição catalisadora conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 e 2, **caracterizado** por ser para diminuir o teor de lactose de um produto.

Resumo**COMPOSIÇÃO CATALISADORA, PROCESSO DE PRODUÇÃO DE
COMPOSIÇÃO CATALISADORA, PROCESSO DE OBTENÇÃO DE PRODUTOS
COM BAIXO TEOR DE LACTOSE E USO DE COMPOSIÇÃO CATALISADORA**

A presente invenção descreve um processo de produção de produtos com baixo teor de lactose utilizando um biocatalisador imobilizado, de modo a permitir sua aplicação industrial e reutilização. Especificamente, a presente invenção compreende o uso da enzima β -galactosidase imobilizada em um suporte de colágeno funcionalizado. A presente invenção se situa nos campos de engenharia de alimentos, químico e farmacêutico.

FIGURAS

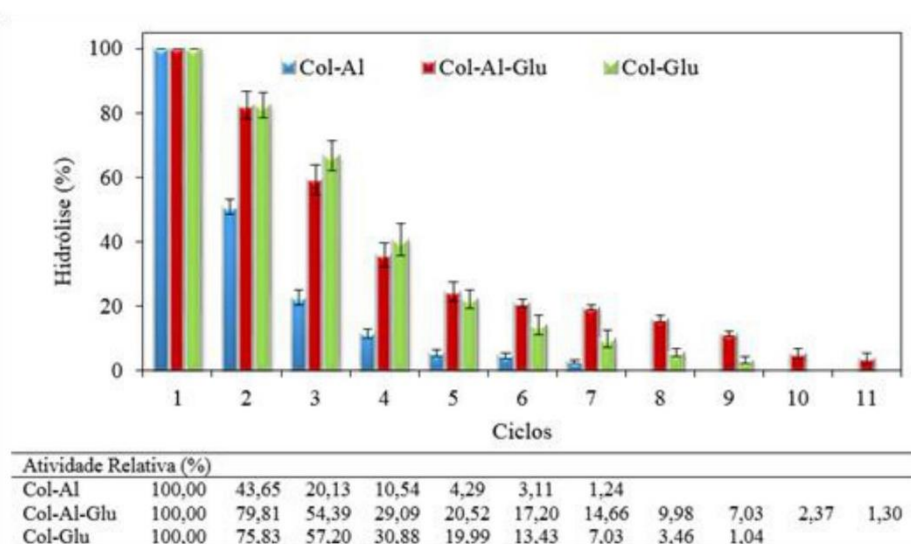


Figura 1

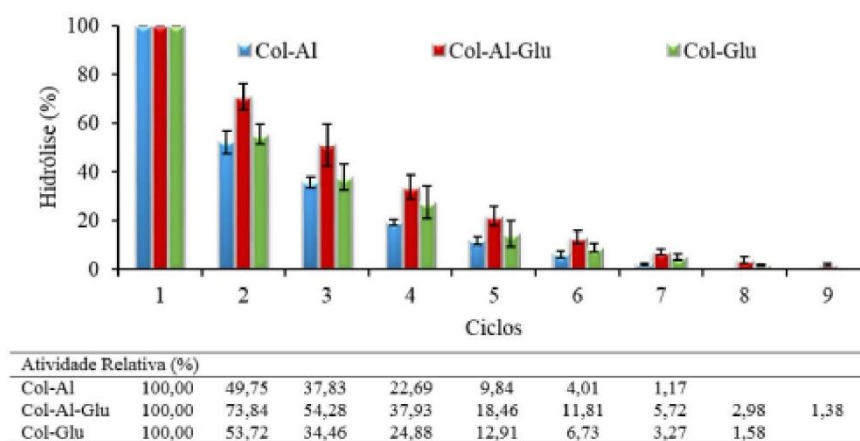


Figura 2

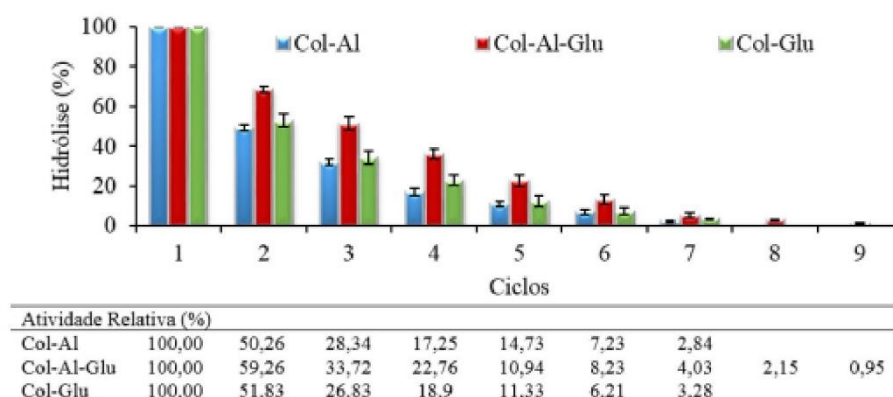


Figura 3

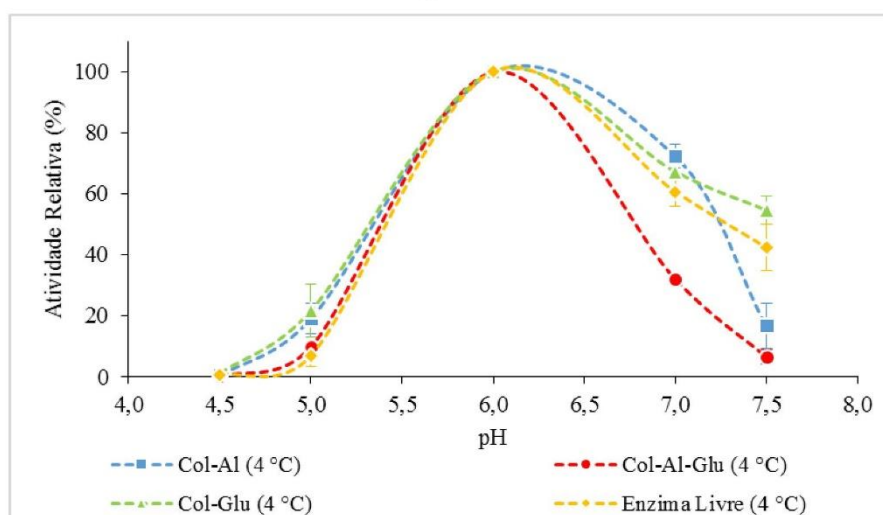


Figura 4

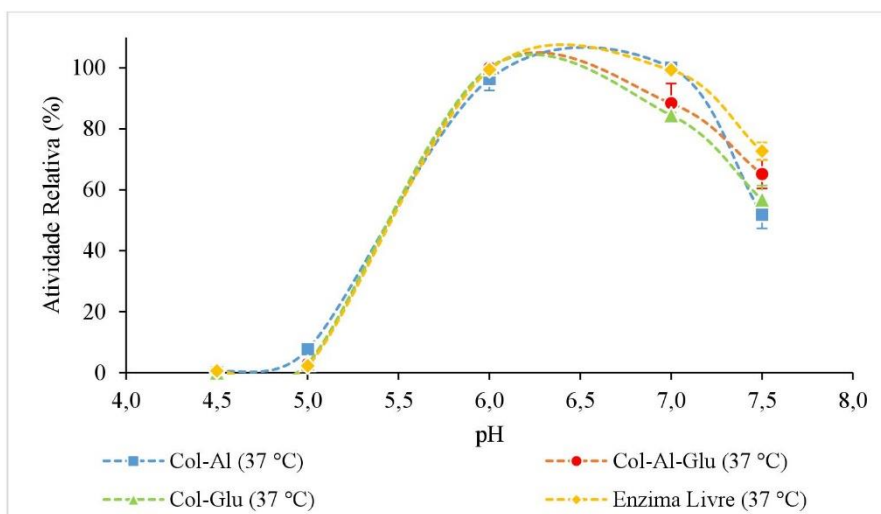


Figura 5

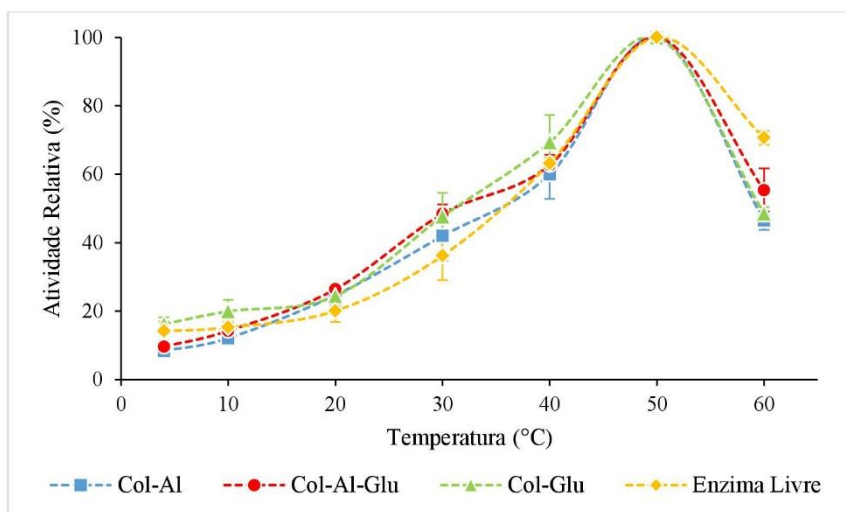


Figura 6

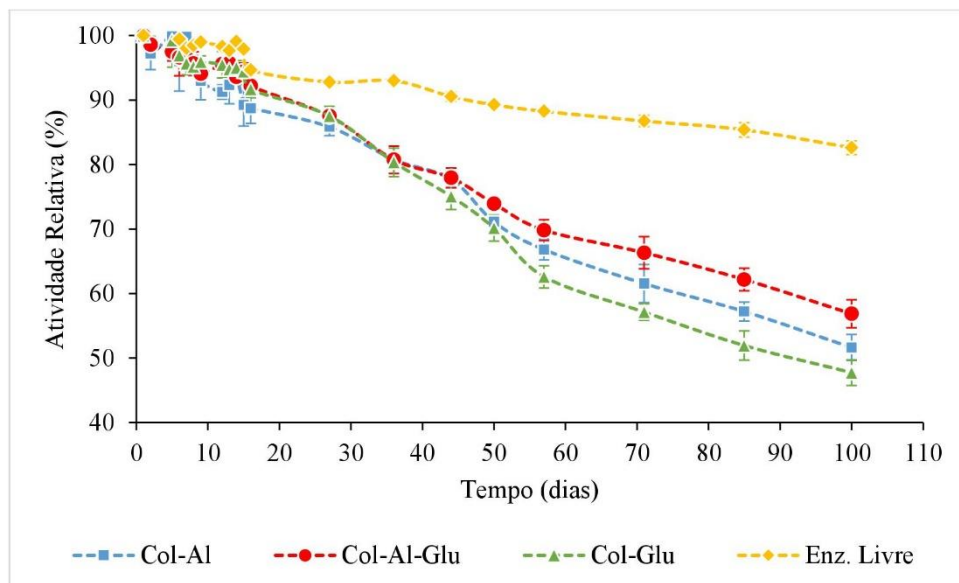


Figura 7